



(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)



1-0052214

(51)⁷ C07F 9/6521; C07F 9/6558

(13) B

(21) 1-2019-04735

(22) 31/01/2018

(86) PCT/US2018/016301 31/01/2018

(87) WO 2018/144640 09/08/2018

(30) 62/453,437 01/02/2017 US; 62/469,912 10/03/2017 US; 62/488,366 21/04/2017 US;
62/575,248 20/10/2017 US

(45) 27/10/2025 451

(43) 30/01/2020 382A

(73) Atea Pharmaceuticals, Inc. (US)

125 Summer Street Boston, MA 02110, United States of America

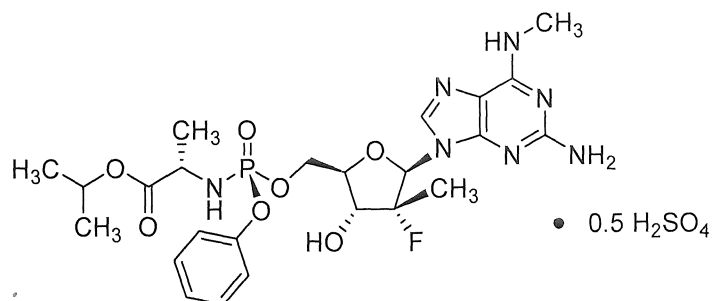
(72) MOUSSA, Adel (US); SOMMADOSSI, Jean-Pierre (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT NUCLEOTIT DẠNG MUỐI HEMI-SULFAT DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ
BỆNH NHIỄM VIRUT VIÊM GAN C VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(21) 1-2019-04735

(57) Sáng chế đề cập đến muối hemi-sulfat có công thức:



để điều trị vật chủ bị nhiễm virus viêm gan C, cũng như các dược phẩm và các dạng liều, bao gồm các dạng liều rắn, của nó.

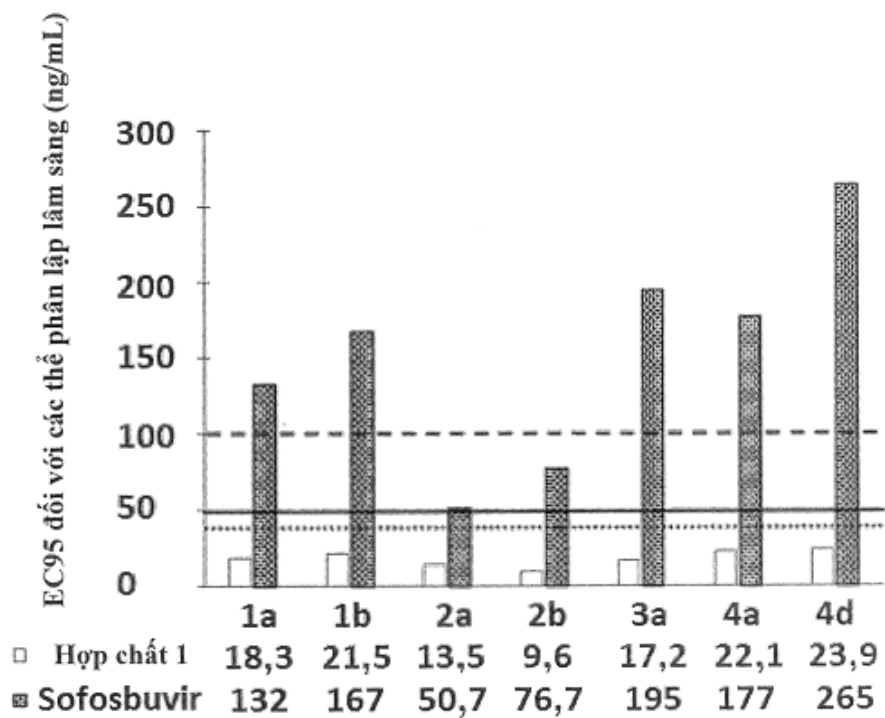


FIG. 24

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến muối hemi-sulfat của hợp chất nucleotit được chọn có các đặc tính điều trị bất ngờ để điều trị vật chủ bị nhiễm virus viêm gan C, cũng như các dược phẩm và các dạng liều của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

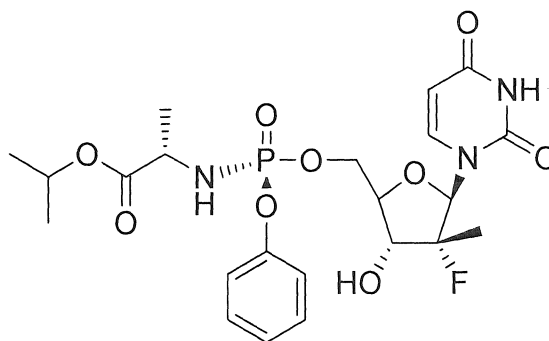
Virus viêm gan C (Hepatitis C Virus: HCV) là virus ARN sợi đơn và là thành viên thuộc giống Hepacivirut. Ước tính rằng 75% tổng số ca bệnh về gan là do HCV gây ra. Bệnh nhiễm HCV có thể dẫn đến bệnh xơ gan và bệnh ung thư gan, và nếu để tiến triển, suy gan mà bệnh này có thể cần đến cấy ghép gan. Khoảng 71 triệu người trên thế giới đang sống với bệnh HCV mạn tính và khoảng 399.000 người chết mỗi năm do HCV, chủ yếu là do bệnh xơ gan và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan.

ARN polymeraza là đích chính để phát triển thuốc kháng các virus ARN sợi đơn. Protein phi cấu trúc của HCV NS5B – một loại ARN polymeraza phụ thuộc ARN - là enzym chính có chức năng khởi đầu và xúc tác quá trình tổng hợp ARN của virus. Có hai phân lớp chính của các chất ức chế NS5B: chất tương tự nucleosit và chất ức chế phi nucleosit (non-nucleoside inhibitor: NNI). Các chất tương tự nucleosit được đồng hóa thành các triphosphat hoạt tính đóng vai trò cơ chất thay thế đối với polymeraza và các chất ức chế phi nucleosit (NNI) liên kết với các vùng dị lập thể trên protein. Các chất ức chế nucleosit hoặc nucleotit bắt chước các cơ chất tự nhiên của polymeraza và đóng vai trò yếu tố kết thúc chuỗi. Chúng ức chế sự khởi đầu phiên mã ARN và sự kéo dài của chuỗi ARN mới sinh.

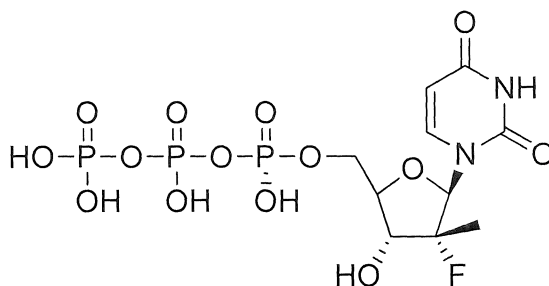
Ngoài việc hướng đích ARN polymeraza, các protein khác của virus ARN có thể còn được hướng đích bằng liệu pháp kết hợp. Ví dụ, các protein của HCV mà là các đích bổ sung cho các phương án điều trị là NS3/4A (một loại serin proteaza) và NS5A (một

loại protein phi cấu trúc là thành phần thiết yếu của replicaza của HCV và gây ra nhiều tác động đến các con đường của tế bào).

Vào tháng 12-2013, chất ức chế polymeraza NS5B dạng nucleosit đầu tiên là sofosbuvir (Sovaldi[®], Gilead Sciences) được phê chuẩn. Sovaldi[®] là tiền dược chất uridin phosphoramidat được hấp thu bởi các tế bào gan và trải qua quá trình hoạt hóa nội bào thu được chất chuyển hóa hoạt tính, 2'-deoxy-2'- α -flo- β -C-metyluridin-5'-triphosphat.



Sovaldi[®]



2'-deoxy-2'- α -flo- β -C-metyluridin-5'-triphosphat

Sovaldi[®] là thuốc đầu tiên thể hiện độ an toàn và hiệu quả trong điều trị một số loại bệnh nhiễm HCV mà không cần dùng đồng thời với interferon. Sovaldi[®] là thuốc thứ ba có chỉ định liệu pháp đột phá để nhận được sự phê chuẩn của Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA).

Vào năm 2014, FDA đã phê chuẩn Harvoni[®] (ledipasvir, một chất ức chế NS5A, và sofosbuvir) để điều trị bệnh nhiễm mạn tính virus viêm gan C kiểu gen 1. Harvoni[®] là thuốc viên kết hợp đầu tiên được phê chuẩn để điều trị bệnh nhiễm mạn tính HCV kiểu gen 1. Nó cũng là chế độ được phê chuẩn đầu tiên mà không cần dùng kết hợp với interferon hoặc ribavirin. Ngoài ra, FDA đã phê chuẩn simeprevir (Olysio[™]) kết hợp với sofosbuvir (Sovaldi[®]) dưới dạng một lần/ngày, đều qua đường miệng, điều trị không có interferon và ribavirin đối với người trưởng thành bị nhiễm HCV kiểu gen 1.

FDA cũng phê chuẩn AbbVie's VIEKIRA PakTM vào năm 2014, gói nhiều viên chứa dasabuvir (một chất ức chế polymeraza NS5B phi nucleosit), ombitasvir (một chất ức chế NS5A), paritaprevir (một chất ức chế NS3/4A), và ritonavir. VIEKIRA PakTM có thể được sử dụng có hoặc không có ribavirin để điều trị các bệnh nhân bị nhiễm HCV kiểu gen 1 bao gồm các bệnh nhân bị bệnh xơ gan còn bù. VIEKIRA PakTM không cần đến liệu pháp kết hợp với interferon.

Vào tháng 7-2015, FDA đã phê chuẩn TechnivieTM và DaklinzaTM để lần lượt điều trị HCV kiểu gen 4 và HCV kiểu gen 3. TechnivieTM (Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir) được phê chuẩn để sử dụng kết hợp với ribavirin để điều trị HCV kiểu gen 4 ở các bệnh nhân không tạo sẹo và bệnh xơ gan và là lựa chọn đầu tiên cho các bệnh nhân bị nhiễm HCV-4 là những người không cần đến việc dùng kết hợp với interferon. DaklinzaTM được phê chuẩn để sử dụng với Sovaldi[®] để điều trị bệnh nhiễm HCV kiểu gen 3. DaklinzaTM là thuốc đầu tiên thể hiện độ an toàn và hiệu quả trong điều trị HCV kiểu gen 3 mà không cần dùng kết hợp với interferon hoặc ribavirin.

Vào tháng 10-2015, FDA cảnh báo rằng việc điều trị HCV bằng Viekira Pak và Technivie có thể gây tổn thương gan nghiêm trọng chủ yếu ở các bệnh nhân bị bệnh gan tiến triển và yêu cầu rằng cần phải bổ sung thêm thông tin về độ an toàn lên nhãn.

Các liệu pháp khác hiện đã được phê chuẩn đối với HCV bao gồm interferon alpha-2b hoặc PEG-interferon alpha-2b (Pegintron[®]), có thể được dùng với ribavirin (Rebetol[®]), NS3/4A telaprevir (Incivek[®], Vertex và Johnson & Johnson), boceprevir (VictrelisTM, Merck), simeprevir (OlysioTM, Johnson & Johnson), paritaprevir (AbbVie), Ombitasvir (AbbVie), NNI Dasabuvir (ABT-333) và Merck's ZepatierTM (kết hợp thành viên nén duy nhất gồm hai thuốc grazoprevir và elbasvir).

Các chất ức chế polymeraza NS5B khác hiện đang trong quá trình phát triển. Merck đang phát triển tiền dược chất nucleotit uridin MK-3682 (trước đây là Idenix IDX21437) và thuốc này đang trong thử nghiệm kết hợp giai đoạn II.

Các patent Mỹ và Công bố đơn quốc tế mô tả các chất ức chế polymeraza nucleosit để điều trị Flaviviridae, bao gồm HCV, bao gồm các đơn được nộp bởi Idenix Pharmaceuticals (6,812,219; 6,914,054; 7,105,493; 7,138,376; 7,148,206; 7,157,441; 7,163,929; 7,169,766; 7,192,936; 7,365,057; 7,384,924; 7,456,155; 7,547,704; 7,582,618; 7,608,597; 7,608,600; 7,625,875; 7,635,689; 7,662,798; 7,824,851;

7,902,202; 7,932,240; 7,951,789; 8,193,372; 8,299,038; 8,343,937; 8,362,068; 8,507,460; 8,637,475; 8,674,085; 8,680,071; 8,691,788; 8,742,101; 8,951,985; 9,109,001; 9,243,025; US2016/0002281; US2013/0064794; WO/2015/095305; WO/2015/081133; WO/2015/061683; WO/2013/177219; WO/2013/039920; WO/2014/137930; WO/2014/052638; WO/2012/154321); Merck (6,777,395; 7,105,499; 7,125,855; 7,202,224; 7,323,449; 7,339,054; 7,534,767; 7,632,821; 7,879,815; 8,071,568; 8,148,349; 8,470,834; 8,481,712; 8,541,434; 8,697,694; 8,715,638; 9,061,041; 9,156,872 và WO/2013/009737); Emory University (6,348,587; 6,911,424; 7,307,065; 7,495,006; 7,662,938; 7,772,208; 8,114,994; 8,168,583; 8,609,627; US 2014/0212382; và WO2014/1244430); Gilead Sciences/ Pharmasset Inc. (7,842,672; 7,973,013; 8,008,264; 8,012,941; 8,012,942; 8,318,682; 8,324,179; 8,415,308; 8,455,451; 8,563,530; 8,841,275; 8,853,171; 8,871,785; 8,877,733; 8,889,159; 8,906,880; 8,912,321; 8,957,045; 8,957,046; 9,045,520; 9,085,573; 9,090,642; và 9,139,604) và (6,908,924; 6,949,522; 7,094,770; 7,211,570; 7,429,572; 7,601,820; 7,638,502; 7,718,790; 7,772,208; RE42,015; 7,919,247; 7,964,580; 8,093,380; 8,114,997; 8,173,621; 8,334,270; 8,415,322; 8,481,713; 8,492,539; 8,551,973; 8,580,765; 8,618,076; 8,629,263; 8,633,309; 8,642,756; 8,716,262; 8,716,263; 8,735,345; 8,735,372; 8,735,569; 8,759,510 và 8,765,710); Hoffman La-Roche (6,660,721), Roche (6,784,166; 7,608,599; 7,608,601 và 8,071,567); Alios BioPharma Inc. (8,895,723; 8,877,731; 8,871,737; 8,846,896; 8,772,474; 8,980,865; 9,012,427; US 2015/0105341; US 2015/0011497; US 2010/0249068; US2012/0070411; WO 2015/054465; WO 2014/209979; WO 2014/100505; WO 2014/100498; WO 2013/142159; WO 2013/142157; WO 2013/096680; WO 2013/088155; WO 2010/108135), Enanta Pharmaceuticals (US 8,575,119; 8,846,638; 9,085,599; WO 2013/044030; WO 2012/125900), Biota (7,268,119; 7,285,658; 7,713,941; 8,119,607; 8,415,309; 8,501,699 và 8,802,840), Biocryst Pharmaceuticals (7,388,002; 7,429,571; 7,514,410; 7,560,434; 7,994,139; 8,133,870; 8,163,703; 8,242,085 và 8,440,813), Alla Chem, LLC (8,889,701 và WO 2015/053662), Inhibitex (8,759,318 và WO/2012/092484), Janssen Products (8,399,429; 8,431,588; 8,481,510; 8,552,021; 8,933,052; 9,006,29 và 9,012,428) the University of Georgia Foundation (6,348,587; 7,307,065; 7,662,938; 8,168,583; 8,673,926; 8,816,074; 8,921,384 và 8,946,244), RFS Pharma, LLC (8,895,531; 8,859,595; 8,815,829; 8,609,627; 7,560,550; US

2014/0066395; US 2014/0235566; US 2010/0279969; WO/2010/091386 và WO 2012/158811) University College Cardiff Consultants Limited (WO/2014/076490, WO 2010/081082; WO/2008/062206), Achillion Pharmaceuticals, Inc. (WO/2014/169278 và WO 2014/169280), Cocystal Pharma, Inc. (US 9,173,893), Katholieke Universiteit Leuven (WO 2015/158913), Catabasis (WO 2013/090420) và the Regents of the University of Minnesota (WO 2006/004637).

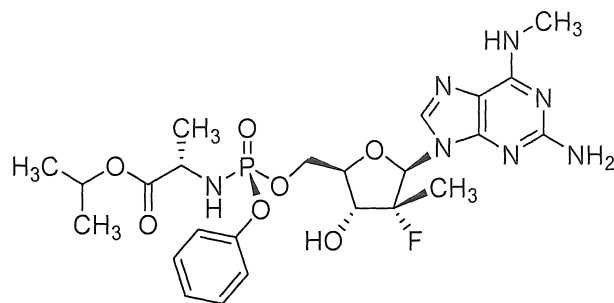
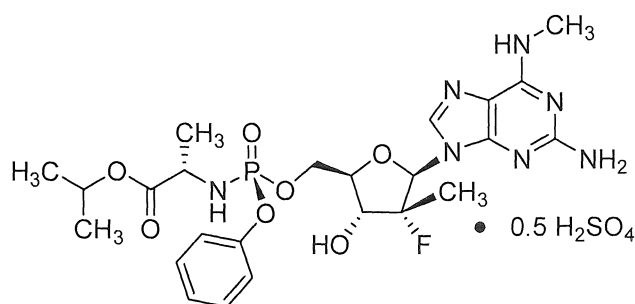
Atea Pharmaceuticals, Inc. bộc lộ các nucleotit β -D-2'-deoxy-2'- α -flo-2'- β -C-được thế-2-được cải biến-N⁶-(mono- và di-metyl) purin để điều trị HCV trong patent Mỹ số 9,828,410 và đơn PCT số WO 2016/144918. Atea cũng bộc lộ các nucleotit β -D-2'-deoxy-2'-được thế-4'-được thế-2-N⁶-được thế-6-aminopurin để điều trị các bệnh nhiễm paramyxovirut và orthomyxovirut trong US 2018/0009836 và WO 2018/009623.

Vẫn rất cần phát triển các liệu pháp kháng HCV an toàn, hiệu quả và dung nạp tốt. Yêu cầu này được nhấn mạnh khi tính đến tính kháng thuốc. Các thuốc kháng virus tác dụng trực tiếp hiệu nghiệm hơn có thể rút ngắn đáng kể thời gian điều trị và cải thiện sự tuân thủ và tỷ lệ đáp ứng ổn định với virus (sustained viral response: SVR) đối với các bệnh nhân bị nhiễm tất cả các kiểu gen của HCV.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất, dược phẩm, phương pháp, và dạng liều để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm HCV.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Ngạc nhiên phát hiện ra rằng muối hemisulfat của Hợp chất **1**, được đề xuất dưới đây dưới dạng Hợp chất **2**, có các đặc tính vượt trội bất ngờ, bao gồm độ sinh khả dụng được tăng cường và tính chọn lọc cơ quan đích, so với bazơ tự do của nó (Hợp chất **1**). Các ưu điểm bất ngờ này không thể dự đoán trước được. Do đó, Hợp chất **2** là hợp phần ưu việt về điều trị để dùng với lượng hữu hiệu cho vật chủ cần điều trị, thường là người, để điều trị bệnh viêm gan C. Hợp chất **2** được gọi là muối hemi-sulfat của isopropyl((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat. Hợp chất **1** được bộc lộ trong patent Mỹ số 9,828,410.

**Hợp chất 1****Hợp chất 2**

Hợp chất 2, dưới dạng Hợp chất 1, được chuyển hóa thành nucleotit triphosphat tương ứng (Hợp chất 1-6) trong tế bào, nucleotit này là chất chuyển hóa hoạt tính và chất ức chế ARN polymeraza (xem Sơ đồ 1 dưới đây). Do Hợp chất 1-6 được tạo ra trong tế bào và không rời khỏi tế bào, nó không đo được trong huyết tương. Tuy nhiên, Hợp chất chuyển hóa 5'-OH 1-7 (xem Sơ đồ 1) được tiết ra khỏi tế bào, và do đó có thể đo được trong huyết tương và đóng vai trò đại diện cho nồng độ của Hợp chất chuyển hóa hoạt tính nội bào 1-6.

Đã phát hiện ra rằng nồng độ trong huyết tương *in vivo* của Hợp chất đại diện 1-7, và do đó Hợp chất nội bào 1-6, về cơ bản cao hơn khi Hợp chất 2 được dùng *in vivo* so với khi Hợp chất 1 được dùng *in vivo*. Bằng cách so sánh đôi đầu các con chó được định liều (dùng liều) Hợp chất 1 và Hợp chất 2 (Ví dụ 19, bảng 28), định liều Hợp chất 2 đạt được AUC_(0-4hr) của chất chuyển hóa nucleosit guanin có đầu tận cùng 5'-OH (1-7) cao gấp hai lần AUC sau định liều Hợp chất 1. Bất ngờ rằng muối không cộng hóa trị có tác dụng như vậy đối với nồng độ trong huyết tương của dược chất gốc (Hợp chất 1).

Ngoài ra, Hợp chất 2 phân chia (phân phối) chọn lọc *in vivo* đến gan so với tim (Ví dụ 19, Bảng 29), điều này có lợi do gan là cơ quan bị bệnh ở các vật chủ bị nhiễm

HCV. Chó được định liều Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 2 và nồng độ của triphosphat hoạt tính (1-6) trong gan và tim được đo. Tỷ lệ nồng độ triphosphat hoạt tính ở gan so với tim là cao hơn sau định liều Hợp chất 2 so với Hợp chất 1 như được thể hiện trong Bảng 29. Cụ thể, tỷ lệ phân chia đến gan/tim đối với Hợp chất 2 là 20 so với tỷ lệ phân chia đến gan/tim 3,1 đối với Hợp chất 1. Số liệu này bất ngờ chỉ ra rằng việc dùng Hợp chất 2 dẫn đến sự phân bố ưu tiên của guanin triphosphat hoạt tính (Hợp chất 1-6) trong gan so với tim so với Hợp chất 1, làm giảm tác dụng lệch đích tiềm tàng. Bất ngờ rằng việc dùng Hợp chất 2 có thể làm giảm đáng kể sự phân chia lệch đích không mong muốn. Điều này cho phép dùng Hợp chất 2 ở liều cao hơn Hợp chất 1, nếu cần bởi chuyên viên y tế.

Ngoài ra, các mức độ trong mô gan và tim của dẫn xuất guanin triphosphat hoạt tính của Hợp chất 2 (chất chuyển hóa 1-6) được đo sau các liều dùng qua đường miệng của Hợp chất 2 ở các con chuột cống và khỉ (Ví dụ 20). Mức độ cao của guanin triphosphat hoạt tính (1-6) được đo trong gan của tất cả các loài được thử nghiệm. Quan trọng là, các mức không định lượng được của guanin triphosphat (1-6) được đo trong tim khỉ, và đây là chỉ báo về sự tạo triphosphat hoạt tính đặc hiệu gan. Do đó, phát hiện ra rằng so với định liều Hợp chất 1, định liều Hợp chất 2 cải thiện sự phân bố guanin triphosphat (1-6).

Khi dùng cho người khỏe mạnh và bệnh nhân bị nhiễm virus viêm gan C, Hợp chất 2 được dung nạp tốt sau khi dùng liều đơn qua đường miệng và các thông số dược động học C_{max} , T_{max} và AUC_{tot} là tương đương ở cả hai nhóm (các Bảng 34 và 35). Như được mô tả trong Ví dụ 24, liều đơn của Hợp chất 2 ở bệnh nhân bị nhiễm HCV tạo ra hoạt tính kháng virus đáng kể. Mức biểu hiện trong huyết tương của chất chuyển hóa 1-7 là hầu như tỷ lệ với liều trong phạm vi nghiên cứu.

Các phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ đối với các bệnh nhân được định liều Hợp chất 2 cho thấy rằng đáp ứng virus tương quan với mức biểu hiện trong huyết tương của chất chuyển hóa 1-7 của Hợp chất 2 (Ví dụ 24, FIG. 23A-23F), chỉ ra rằng các đáp ứng virus hoàn toàn có thể đạt được bằng các liều mạnh của Hợp chất 2.

Ví dụ 24 xác nhận rằng, theo các phương án không giới hạn, các liều đơn dùng qua đường miệng 300 mg, 400 mg, và 600 mg tạo ra hoạt tính kháng virus đáng kể ở người. Nồng độ cực tiểu trong huyết tương C_{24} của chất chuyển hóa 1-7 sau một liều 600

mg của Hợp chất 2 đã nhân đôi nồng độ cực tiểu trong huyết tương C_{24} của chất chuyển hóa 1-7 sau một liều 300 mg của Hợp chất 2.

FIG. 24 và Ví dụ 25 nêu bật sáng chế được đề xuất bằng Hợp chất 2 để điều trị viêm gan C. Như được thể hiện trên FIG. 24, mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 sau định liều Hợp chất 2 ở người (600 mg QD (550 mg đương lượng bazơ tự do) và 450 mg QD (400 mg đương lượng bazơ tự do)) được dự đoán và so sánh với EC_{95} của Hợp chất 1 *in vitro* đối với một loạt các thể phân lập lâm sàng HCV để xác định xem nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định có luôn cao hơn EC_{95} hay không, có thể dẫn đến hiệu quả cao kháng nhiều thể phân lập lâm sàng *in vivo*. EC_{95} đối với Hợp chất 1 là giống như EC_{95} của Hợp chất 2. Để Hợp chất 2 có hiệu quả, mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định của chất chuyển hóa 1-7 cần vượt quá EC_{95} .

Như được thể hiện trên FIG. 24, EC_{95} của Hợp chất 2 kháng tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm nằm trong khoảng từ 18 nM đến 24 nM.

Như được thể hiện trên FIG. 24, Hợp chất 2 ở liều 450 mg QD (400 mg đương lượng bazơ tự do) ở người tạo ra nồng độ cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán ($C_{24,ss}$) khoảng 40 ng/mL. Hợp chất 2 ở liều 600 mg QD (550 mg đương lượng bazơ tự do) ở người tạo ra nồng độ cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán ($C_{24,ss}$) khoảng 50 ng/mL.

Do đó, nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán của chất chuyển hóa đại diện 1-7 là hầu như gấp đôi EC_{95} kháng tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm (ngay cả dạng khó điều trị GT3a), chỉ ra hiệu năng vượt trội.

Ngược lại, EC_{95} của chuẩn nucleotit chữa trị sofosbuvir (Sovaldi) nằm trong khoảng từ 50 nM đến 265 nM đối với tất cả các thể phân lập lâm sàng HCV được thử nghiệm, với EC_{95} nhỏ hơn nồng độ ở trạng thái ổn định dự đoán ở liều thương mại 400 mg đối với chỉ hai thể phân lập, GT2a và GT2b. EC_{95} đối với liều thương mại 400 mg sofosbuvir là cao hơn nồng độ ở trạng thái ổn định dự đoán đối với các thể phân lập lâm sàng khác, GT1a, GT1b, GT3a, GT4a, và GT4d.

Số liệu so sánh hiệu quả và các thông số trạng thái ổn định được động học trên FIG. 24 chứng tỏ tầm quan trọng điều trị bất ngờ của Hợp chất 2 để điều trị viêm gan C. Thực tế, mức trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán ($C_{24,ss}$) sau khi dùng Hợp

chất 2 được dự đoán là cao hơn ít nhất 2 lần so với EC₉₅ đối với tất cả các kiểu gen được thử nghiệm, và hiệu nghiệm kháng GT2 cao hơn từ 3 đến 5 lần. Số liệu này chỉ ra rằng Hợp chất 2 có hoạt tính kháng virus toàn kiểu gen hiệu nghiệm ở người. Như được thể hiện trên FIG. 24, EC₉₅ của sofosbuvir kháng GT1, GT3, và GT4 là cao hơn 100 ng/mL. Do đó ngạc nhiên là, Hợp chất 2 có hoạt tính kháng HCV ở dạng liều mà phân phối nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định (40-50 ng/mL) thấp hơn nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định (khoảng 100 ng/mL) đạt được bằng dạng liều tương đương của sofosbuvir.

Theo một phương án, do đó, sáng chế bao gồm dạng liều của Hợp chất 2 mà tạo ra nồng độ cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định (C_{24,ss}) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 15-75 ng/mL, ví dụ, 20-60 ng/mL, 25-50 ng/mL, 40-60 ng/mL, hoặc thậm chí 40-50 ng/mL. Điều này gây bất ngờ do thực tế nồng độ ở trạng thái ổn định của chất chuyển hóa tương đương sofosbuvir là khoảng 100 ng/mL.

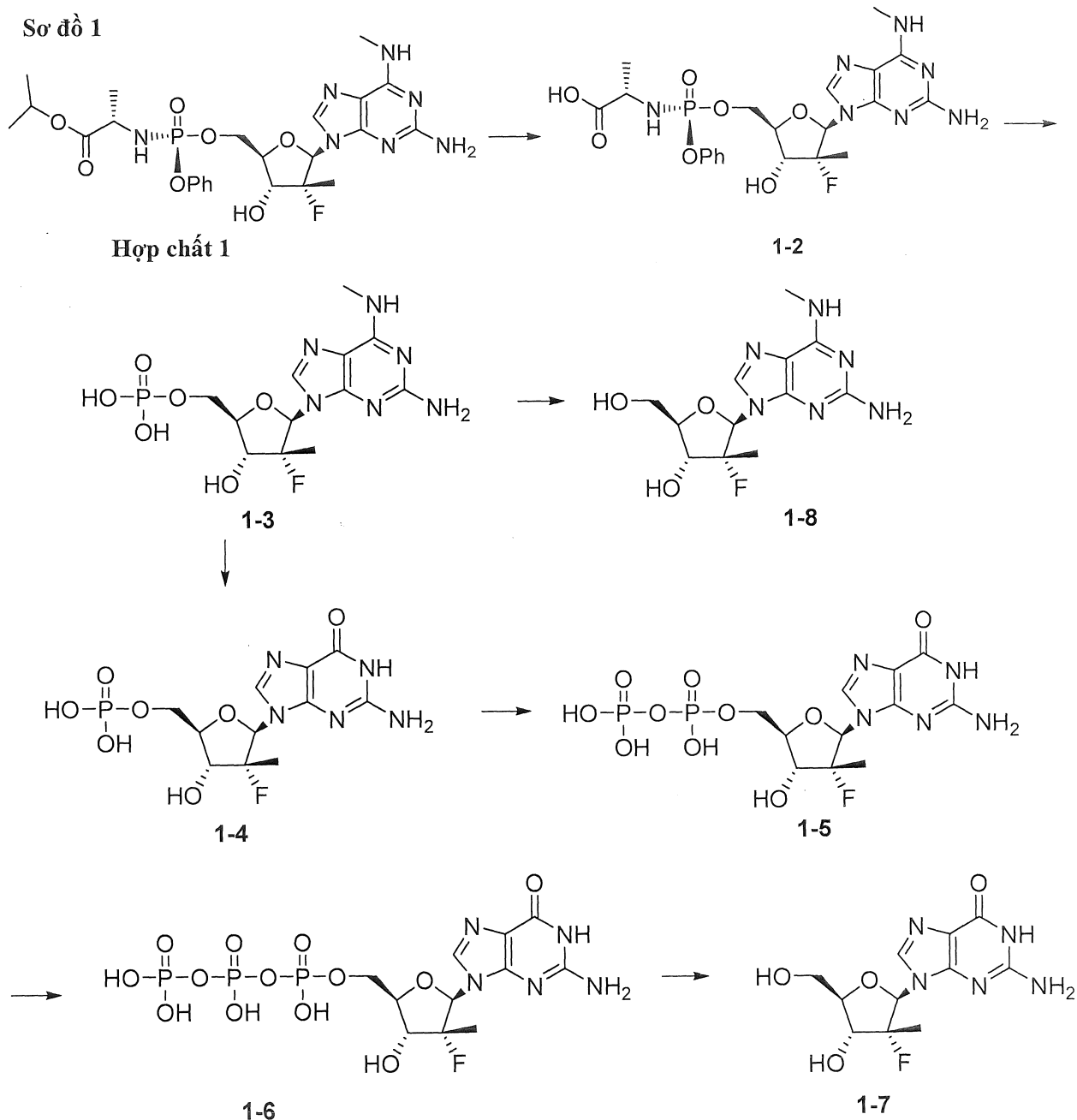
Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng Hợp chất 2 là muối ổn định bất ngờ, độ tan cao, không hút ẩm và có hoạt tính kháng HCV. Điều này gây bất ngờ do nhiều muối của Hợp chất 1 không phải muối hemi-sulfat (Hợp chất 2), bao gồm muối mono-sulfat (Hợp chất 3), là không ổn định vật lý, mà thực tế là các chất rắn chảy rữa hoặc trở thành gôm (Ví dụ 4), và do đó không thích hợp cho dạng liều rắn ổn định. Ngạc nhiên là, mặc dù Hợp chất 2 không trở thành gôm, độ tan trong nước của nó cao hơn lên đến 43 lần so với Hợp chất 1 và cao hơn 6 lần so với Hợp chất 1 trong điều kiện dịch dạ dày mô phỏng (SGF) (Ví dụ 15).

Như được bàn luận trong Ví dụ 16, Hợp chất 2 vẫn ở trạng thái chất rắn màu trắng với IR tương ứng với chuẩn tham chiếu trong 6 tháng trong điều kiện độ ổn định tăng tốc (40 °C/75% RH). Hợp chất 2 là ổn định trong 9 tháng ở điều kiện môi trường (25 °C/60% RH) và điều kiện lạnh (5 °C).

Các dạng liều rắn (viên nén 50 mg và 100 mg) của Hợp chất 2 cũng ổn định hóa học trong điều kiện tăng tốc (40 °C/75% RH) và điều kiện lạnh (5 °C) trong 6 tháng (Ví dụ 26). Hợp chất 2 là ổn định trong điều kiện môi trường (25 °C/60% RH) ở dạng liều rắn trong ít nhất 9 tháng.

Sơ đồ 1 đưa ra con đường chuyển hóa của Hợp chất 1 và Hợp chất 2, bao gồm trước hết khử este hóa phosphoramidat (chất chuyển hóa 1-1) tạo ra chất chuyển hóa 1-2. Chất chuyển hóa 1-2 tiếp theo được chuyển hóa thành dẫn xuất N⁶-metyl-2,6-

diaminopurin-5'-monophosphat (chất chuyển hóa 1-3), chất này lại được chuyển hóa thành nucleosit tự do 5'-hydroxyl-N⁶-metyl-2,6-diaminopurin (chất chuyển hóa 1-8) và ((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metyl dihydro phosphat dưới dạng 5'-monophosphat (chất chuyển hóa 1-4). Chất chuyển hóa 1-4 được đồng hóa thành diphosphat tương ứng (chất chuyển hóa 1-5) và tiếp theo dẫn xuất triphosphat hoạt tính (chất chuyển hóa 1-6). 5'-triphosphat có thể được chuyển hóa tiếp tạo ra 2-amino-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-metyltetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (1-7). Chất chuyển hóa 1-7 có thể đo được trong huyết tương và do đó đại diện cho triphosphat hoạt tính (1-6), là chất không đo được trong huyết tương.



Theo một phương án, sáng chế là Hợp chất 2 và ứng dụng của nó để điều trị viêm gan C (HCV) ở vật chủ cần điều trị, tùy ý trong chất mang dược dụng. Theo một khía cạnh, Hợp chất 2 được sử dụng dưới dạng chất rắn vô định hình. Theo khía cạnh khác, Hợp chất 2 được sử dụng dưới dạng chất rắn kết tinh (dạng tinh thể).

Sáng chế còn bao gồm quy trình được lấy làm ví dụ không giới hạn để điều chế Hợp chất 2 bao gồm các bước:

- (i) hòa tan Hợp chất 1 trong dung môi hữu cơ, ví dụ, axeton, etyl axetat, metanol, axetonitril, hoặc ete, hoặc dạng tương tự, trong bình tam giác hoặc vật chứa;
- (ii) nạp dung môi hữu cơ thứ hai vào bình tam giác hoặc vật chứa thứ hai, có thể giống hoặc khác với dung môi hữu cơ trong bước (i), tùy ý làm lạnh dung môi thứ hai xuống đến 0-10 độ C, và bổ sung bằng cách nhỏ giọt H_2SO_4 vào dung môi hữu cơ thứ hai tạo ra hỗn hợp H_2SO_4 /dung môi; và trong đó dung môi ví dụ có thể là metanol;
- (iii) bổ sung bằng cách nhỏ giọt hỗn hợp H_2SO_4 /dung môi ở tỷ lệ mol 0,5/1,0 từ bước (ii) vào dung dịch chứa Hợp chất 1 của bước (i) ở nhiệt độ môi trường hoặc tăng hoặc giảm đôi chút (ví dụ 23-35 độ C);
- (iv) khuấy hỗn hợp phản ứng của bước (iii) cho đến khi kết tủa của Hợp chất 2 được tạo ra, ví dụ ở nhiệt độ môi trường hoặc tăng hoặc giảm đôi chút;
- (v) tùy ý lọc kết tủa thu được từ bước (iv) và rửa bằng dung môi hữu cơ; và
- (vi) tùy ý sấy khô Hợp chất 2 thu được trong chân không, tùy ý ở nhiệt độ gia tăng, ví dụ, 55, 56, 57, 58, 59, hoặc 60 °C.

Theo một phương án, dung môi hữu cơ trong bước (i) là 3-metyl-2-pentanon. Theo một phương án, dung môi hữu cơ trong bước (i) là etyl isopropyl keton. Theo một phương án, dung môi hữu cơ trong bước (i) là metyl propionat. Theo một phương án, dung môi hữu cơ trong bước (i) là etyl butyrat.

Mặc dù có nhiều tài liệu chuyên ngành và đơn sáng chế về nucleosit kháng virus, Hợp chất 2 chưa được bộc lộ cụ thể. Do đó, sáng chế bao gồm Hợp chất 2, hoặc hợp phần dược dụng hoặc dạng liều của nó, như được mô tả trong bản mô tả này.

Các hợp chất, phương pháp, dạng liều, và dược phẩm được đề xuất để điều trị vật chủ bị nhiễm virus HCV nhờ dùng lượng hữu hiệu của Hợp chất 2. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ở liều ít nhất khoảng 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, hoặc 1000 mg. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng trong thời gian lên đến 12 tuần, trong thời gian lên đến 10 tuần, trong thời gian lên đến 8 tuần, trong thời gian lên đến 6 tuần, hoặc trong thời gian lên đến 4 tuần. Theo các phương án khác, Hợp chất 2 được dùng trong thời gian ít nhất 4 tuần, trong thời gian ít nhất 6 tuần, trong thời gian ít nhất 8 tuần, trong thời gian ít nhất 10 tuần, hoặc trong thời gian ít nhất 12 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày hoặc cách nhật. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà đạt được mức cực tiểu trong huyết thanh ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 15-75 ng/mL. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà đạt được mức cực tiểu trong huyết thanh ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20-60 ng/mL. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà đạt được AUC của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 1.200 ng*h/mL và 3.000 ng*h/mL. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà đạt được AUC của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 1.500 và 2.100 ng*h/mL.

Các hợp chất, dược phẩm, và dạng liều có thể cũng được sử dụng để điều trị các tình trạng liên quan như các tình trạng dương tính với kháng thể kháng HCV và dương tính với kháng nguyên HCV, viêm gan mạn tính do virus, bệnh ung thư gan do bệnh viêm gan C tiến triển (bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC)), bệnh xơ gan, bệnh viêm gan C mạn tính hoặc cấp tính, bệnh viêm gan C bạo phát, bệnh viêm gan C kéo dài mạn tính và chứng mệt mỏi do kháng HCV. Hợp chất hoặc chế phẩm bao gồm hợp chất có thể cũng được sử dụng phòng bệnh để ngăn ngừa hoặc hạn chế sự tiến triển của bệnh lâm sàng ở những người dương tính với kháng thể kháng HCV hoặc dương tính với kháng nguyên HCV hoặc những người biểu hiện viêm gan C.

Sáng chế do đó bao gồm các dấu hiệu sau:

- (a) Hợp chất 2 như được mô tả trong bản mô tả này;
- (b) Tiền dược chất của Hợp chất 2

- (c) Sử dụng Hợp chất 2 trong sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C;
- (d) Hợp chất 2 để sử dụng để điều trị viêm gan C, tùy ý trong chất mang dược dụng;
- (e) Phương pháp sản xuất dược phẩm được dự tính để sử dụng điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C, đặc trưng ở chỗ Hợp chất 2, hoặc muối dược dụng, như được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong sản xuất;
- (e) Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị cho vật chủ của Hợp chất 2 với chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng;
- (f) Quy trình điều chế các sản phẩm điều trị chứa lượng hữu hiệu của Hợp chất 2;
- (g) Các dạng liều rắn, bao gồm các dạng liều mà tạo ra profin dược động học ưu việt; và
- (h) Quy trình sản xuất Hợp chất 2, như được mô tả trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu 1-1 (Hợp chất 1 vô định hình), 1-2 (Hợp chất 1 dạng tinh thể), và 1-3 (Hợp chất 2 vô định hình) trước khi thực hiện các nghiên cứu độ ổn định nhằm mục đích xác định đặc điểm như được mô tả trong Ví dụ 2 và Ví dụ 5. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 1B là ảnh sắc ký HPLC của hợp chất 1 vô định hình (mẫu 1-1) để xác định độ tinh khiết như được mô tả trong Ví dụ 2. Độ tinh khiết của mẫu là 98,7%. Trục x là thời gian được đo bằng phút và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 2A là ảnh sắc ký HPLC của Hợp chất 1 dạng tinh thể (mẫu 1-2) để xác định độ tinh khiết như được mô tả trong Ví dụ 2. Độ tinh khiết của mẫu là 99,11%. Trục x là thời gian được đo bằng phút và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 2B là đồ thị DSC và TGA của Hợp chất 1 dạng tinh thể (mẫu 1-2) trước khi thực hiện các nghiên cứu độ ổn định bất kỳ nhằm mục đích xác định đặc điểm như được

mô tả trong Ví dụ 2. Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái là dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm.

FIG. 3 là ảnh tinh thể học tia X của Hợp chất 1 thể hiện hóa lập thể tuyệt đối như được mô tả trong Ví dụ 2.

FIG. 4A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu 1-1 (hợp chất 1 vô định hình), 1-2 (Hợp chất 1 dạng tinh thể), và 1-3 (hợp chất 2 vô định hình) sau khi bảo quản ở 25 °C và 60% độ ẩm tương đối trong 14 ngày như được mô tả trong Ví dụ 2. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 4B là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, và 1-9 sau khi bảo quản ở 25 °C và 60% độ ẩm tương đối trong 7 ngày như được mô tả trong Ví dụ 4. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 5A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu 1-4, 1-6, 1-7, và 1-9 sau khi bảo quản ở 25 °C và 60% độ ẩm tương đối trong 14 ngày như được mô tả trong Ví dụ 4. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 5B là mẫu XRPD của hợp chất 2 vô định hình (mẫu 1-3) như được mô tả trong Ví dụ 5. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 6A là ảnh sắc ký HPLC của hợp chất 2 vô định hình (mẫu 1-3) để xác định độ tinh khiết như được mô tả trong Ví dụ 5. Độ tinh khiết của mẫu là 99,6%. Trục x là thời gian được đo bằng phút và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 6B là đồ thị DSC và TGA đối với hợp chất 2 vô định hình (mẫu 1-3) trước khi thực hiện các nghiên cứu độ ổn định bất kỳ nhằm mục đích xác định đặc điểm như được mô tả trong Ví dụ 5. Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái là dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm.

FIG. 7A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu kết tinh (các mẫu 2-2, 2-6, và 2-7) và các mẫu kết tinh kém (các mẫu 2-3, 2-4, 2-5, và 2-8) được nhận dạng từ các quá trình kết tinh của Hợp chất 2 (Ví dụ 6). Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 7B là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu vô định hình (các mẫu 2-9, 2-10, và 2-11) được nhận dạng từ các quá trình kết tinh của Hợp chất 2 (Ví dụ 6). Trục x là 2θ được đo bằng độ và trục y cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 8A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu (các mẫu 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 và 2-8) sau 6 ngày bảo quản ở 25 °C và 60% độ ẩm tương đối (Ví dụ 6). Trục x là 2θ được đo bằng độ và trục y cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 8B là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-2 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 9A là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-3 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 9B là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-4 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 10A là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-5 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 10B là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-6 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 11A là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-7 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 11B là đồ thị DSC và TGA đối với mẫu 2-8 (Ví dụ 6). Trục x là nhiệt độ được đo bằng °C, trục y bên trái dòng nhiệt được đo bằng (W/g), và trục y bên phải là trọng lượng được đo bằng phần trăm. Các quy trình thực nghiệm đối với tập hợp DSC và TGA được thể hiện trong Ví dụ 2.

FIG. 12A là mẫu XRPD của hợp chất 4 vô định hình (mẫu 3-12) như được bàn luận trong Ví dụ 7. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm. Không quan sát thấy sự kết tinh của muối malonat bất kể dung môi được sử dụng.

FIG. 12B là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu vô định hình (các mẫu 3-6, 3-10, 3-11, và 3-12) được nhận dạng từ quá trình kết tinh thử nghiệm của Hợp chất 1 với muối malonat (Ví dụ 7). Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 13A là ảnh HPLC của mẫu 3-12 từ quá trình kết tinh thử nghiệm của Hợp chất 1 với muối malonat như được mô tả trong Ví dụ 7. Mẫu có độ tinh khiết 99,2%. Trục x là thời gian được đo bằng phút và trục y là cường độ được đo bằng mAu.

FIG. 13B là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu chất rắn thu được từ quá trình kết tinh bằng cách sử dụng LAG (các mẫu 4-13, 4-12, 4-9, 4-3, và 4-1) so với Hợp chất 1 (mẫu 1-2) như được mô tả trong Ví dụ 8. Toàn bộ XRDP đều trùng khớp với các mẫu ion trái dấu axit dạng tinh thể mà không có đỉnh bổ sung. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 14A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu thu được từ việc sử dụng etyl axetat làm dung môi kết tinh (các mẫu 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-8, 6-7, 6-6, 6-5, 6-4, và 6-2) so với Hợp chất 1 dạng tinh thể (mẫu 1-2) như được mô tả trong Ví dụ 10. Các mẫu XRPD thường được phát hiện là trùng khớp với mẫu hợp chất 1 với ngoại lệ là các mẫu 6-2, 6-4, và 6-5 có khác biệt không đáng kể. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

Fig. 14B là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của mẫu 5-1 sau hòa tan lần hai trong MEK và bổ sung đối dung môi xyclohexan và axit pamioc như được mô tả trong Ví dụ

9. Mẫu 5-1, được kết tinh trong axit pamioc, là chất rắn sau chín muối, nhưng mẫu XRPD trùng khớp với mẫu axit pamioc.

FIG. 15A là chồng lớp ảnh nhiễu xạ XRPD của các mẫu thu được từ việc sử dụng ethyl axetat làm dung môi kết tinh (các mẫu 6-5, 6-4, và 6-2) so với Hợp chất 1 dạng tinh thể (mẫu 1-2) như được mô tả trong Ví dụ 10. Các mẫu XRPD thường được phát hiện là trùng khớp với mẫu hợp chất 1 với ngoại lệ là các mẫu 6-2, 6-4, và 6-5 có khác biệt không đáng kể. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm và được đánh dấu axit được sử dụng trong quá trình kết tinh.

FIG. 15B là mẫu XRPD đối với Hợp chất 2 như được mô tả trong Ví dụ 14. Trục x là 2Theta được đo bằng độ và trục y là cường độ được đo bằng số đếm.

FIG. 16A là đồ thị về nồng độ (mức) TP hoạt tính (chất chuyển hóa 1-6) trong gan và tim chuột cống, chó, và khỉ (Ví dụ 18). Trục x là liều được đo bằng mg/kg đối với mỗi loài và trục y là nồng độ TP hoạt tính được đo bằng ng/g.

FIG. 16B là đồ thị về nồng độ TP hoạt tính (chất chuyển hóa 1-6) trong gan và tim chó (n=2) được đo 4 giờ sau khi dùng liều đơn qua đường miệng của Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 2 (Ví dụ 19). Trục x là liều của mỗi hợp chất được đo bằng mg/kg và trục y là nồng độ TP hoạt tính được đo bằng ng/g.

FIG. 17 là profin trong huyết tương của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 ở các con chuột cống dùng liều đơn qua đường miệng 500 mg/kg của Hợp chất 2 (Ví dụ 20) được đo 72 giờ sau định liều. Trục x là thời gian được đo bằng giờ và trục y là nồng độ trong huyết tương được đo bằng ng/mL.

FIG. 18 là profin trong huyết tương của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 ở các con khỉ dùng các liều đơn qua đường miệng 30 mg, 100 mg, hoặc 300 mg của Hợp chất 2 (Ví dụ 20) được đo 72 giờ sau định liều. Trục x là thời gian được đo bằng giờ và trục y là nồng độ trong huyết tương được đo bằng ng/mL.

FIG. 19 là đồ thị về EC₉₅ được đo bằng nM của sofosbuvir và Hợp chất 1 kháng các thể phân lập lâm sàng của HCV. Các giá trị EC₉₅ đối với Hợp chất 1 thấp hơn 7-33 lần so với sofosbuvir (Ví dụ 22). Trục x được đánh dấu bằng kiểu gen và trục y là EC₉₅ được đo bằng nM.

FIG. 20 là đồ thị về EC₅₀ được đo bằng nM của sofosbuvir và Hợp chất 1 kháng các chủng phòng thí nghiệm của HCV các kiểu gen 1a, 1b, 2a, 3a, 4a, và 5a. Hợp chất 1 hiệu nghiệm hơn khoảng 6-11 lần so với sofosbuvir ở các kiểu gen 1-5 (Ví dụ 22). Trục x được đánh dấu bằng kiểu gen và trục y là EC₅₀ được đo bằng nM.

FIG. 21 là đồ thị về profin nồng độ trong huyết tương trung bình-thời gian của Hợp chất 1 sau khi dùng liều đơn của Hợp chất 2 trong tất cả các nhóm của Phần B của nghiên cứu như được mô tả trong Ví dụ 24. Hợp chất 1 được hấp thu nhanh và được chuyển hóa nhanh trong vòng khoảng 8 giờ trong tất cả các nhóm từ Phần B. Trục x là thời gian được đo bằng giờ và trục y là trung bình nhân nồng độ trong huyết tương được đo bằng ng/mL.

FIG. 22 là đồ thị về profin nồng độ trong huyết tương trung bình-thời gian của chất chuyển hóa 1-7 sau khi dùng liều đơn của Hợp chất 2 trong tất cả các nhóm của Phần B của nghiên cứu như được mô tả trong Ví dụ 24. Chất chuyển hóa 1-7 có nồng độ trong huyết tương ổn định trong tất cả các nhóm từ Phần B. Trục x là thời gian được đo bằng giờ và trục y là trung bình nhân nồng độ trong huyết tương được đo bằng ng/mL.

FIG. 23A là phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ của đối tượng tham gia vào nhóm 1b như được mô tả trong Ví dụ 24. Đồ thị thể hiện nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương và mức giảm ARN của HCV. Đường nét đứt đại diện cho nồng độ cực tiểu của chất chuyển hóa 1-7 cần để duy trì đáp ứng với virus lớn hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Trục x là thời gian được đo bằng giờ. Trục y bên trái là nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương được đo bằng ng/mL và trục y bên phải là mức giảm ARN của HCV được đo bằng log₁₀ IU/mL.

FIG. 23B là phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ của đối tượng tham gia vào nhóm 1b như được mô tả trong Ví dụ 24. Đồ thị thể hiện nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương và mức giảm ARN của HCV. Đường nét đứt đại diện cho nồng độ cực tiểu của chất chuyển hóa 1-7 cần để duy trì đáp ứng với virus lớn hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Trục x là thời gian được đo bằng giờ. Trục y bên trái là nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương được đo bằng ng/mL và trục y bên phải là mức giảm ARN của HCV được đo bằng log₁₀ IU/mL.

FIG. 23C là phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ của đối tượng tham gia vào nhóm 1b như được mô tả trong Ví dụ 24. Đồ thị thể hiện nồng độ chất chuyển

hóa 1-7 trong huyết tương và mức giảm ARN của HCV. Đường nét đứt đại diện cho nồng độ cực tiểu của chất chuyển hóa 1-7 cần để duy trì đáp ứng với virus lớn hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Trục x là thời gian được đo bằng giờ. Trục y bên trái là nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương được đo bằng ng/mL và trục y bên phải là mức giảm ARN của HCV được đo bằng log₁₀ IU/mL.

FIG. 23D là phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ của đối tượng tham gia vào nhóm 3b như được mô tả trong Ví dụ 24. Mỗi đồ thị thể hiện nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương và mức giảm ARN của HCV. Đường nét đứt đại diện cho nồng độ cực tiểu của chất chuyển hóa 1-7 cần để duy trì đáp ứng với virus lớn hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Trục x là thời gian được đo bằng giờ. Trục y bên trái là nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương được đo bằng ng/mL và trục y bên phải là mức giảm ARN của HCV được đo bằng log₁₀ IU/mL.

FIG. 23E là phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ của đối tượng tham gia vào nhóm 3b như được mô tả trong Ví dụ 24. Mỗi đồ thị thể hiện nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương và mức giảm ARN của HCV. Đường nét đứt đại diện cho nồng độ cực tiểu của chất chuyển hóa 1-7 cần để duy trì đáp ứng với virus lớn hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Trục x là thời gian được đo bằng giờ. Trục y bên trái là nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương được đo bằng ng/mL và trục y bên phải là mức giảm ARN của HCV được đo bằng log₁₀ IU/mL.

FIG. 23F là phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ của đối tượng tham gia vào nhóm 3b như được mô tả trong Ví dụ 24. Mỗi đồ thị thể hiện nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương và mức giảm ARN của HCV. Đường nét đứt đại diện cho nồng độ cực tiểu của chất chuyển hóa 1-7 cần để duy trì đáp ứng với virus lớn hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Trục x là thời gian được đo bằng giờ. Trục y bên trái là nồng độ chất chuyển hóa 1-7 trong huyết tương được đo bằng ng/mL và trục y bên phải là mức giảm ARN của HCV được đo bằng log₁₀ IU/mL.

FIG. 24 là đồ thị về giá trị EC₉₅ của Hợp chất 1 và sofosbuvir kháng các thể phân lập lâm sàng của các bệnh nhân bị nhiễm HCV GT1, GT2, GT3, và GT4. Đường nằm ngang nét đứt (- - - -) đại diện cho nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định (C_{24,ss}) của nucleosit sofosbuvir sau liều 400 mg QD sofosbuvir. Đường nằm ngang liền nét (—) đại diện cho nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định (C_{24,ss}) của chất chuyển hóa 1-7 sau

600 mg Hợp chất 2 (tương đương với 550 mg Hợp chất 1). Đường nằm ngang chấm chấm (-----) đại diện cho nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 sau 450 mg Hợp chất 2 (tương đương với 400 mg Hợp chất 1). Như được bàn luận trong Ví dụ 25, mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 sau 600 mg và 450 mg Hợp chất 2 vượt quá EC_{95} *in vitro* của Hợp chất 1 kháng tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm. Mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của sofosbuvir chỉ vượt quá EC_{95} ở các thể phân lập lâm sàng GT2. Trục x được đánh dấu bằng các thể phân lập lâm sàng và bảng bên dưới trục x liệt kê các giá trị EC_{95} đối với Hợp chất 1 và sofosbuvir. Trục y là EC_{95} kháng các thể phân lập lâm sàng được đo bằng ng/mL. EC_{95} được biểu diễn dưới dạng đương lượng nucleosit. Sofosbuvir và Hợp chất 2 được dùng hằng ngày (QD).

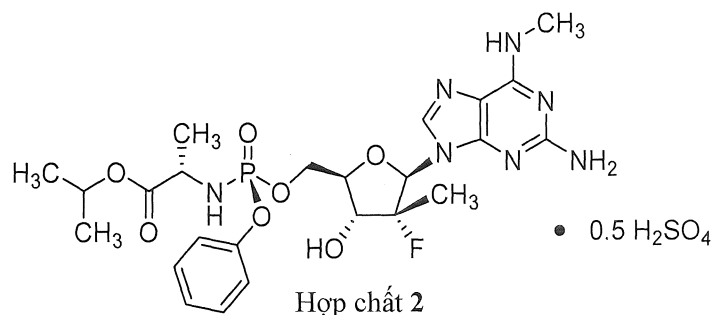
FIG. 25 là lưu đồ thể hiện quy trình sản xuất các viên nén 50 mg và 100 mg của Hợp chất 2 như được mô tả trong Ví dụ 26. Trong bước 1, xenluloza vi tinh thể, Hợp chất 2, lactoza monohydrat, và croscarmellose natri được lọc qua sàng 600 μ M. Trong bước 2, các thành phần từ bước 1 được nạp vào máy trộn chữ V và được trộn trong 5 phút ở 25 vòng/phút (rpm). Trong bước 3, magie stearat được lọc qua sàng 600 μ M. Trong bước 4, magie stearat được nạp vào máy trộn chữ V chứa các thành phần từ bước 2 (xenluloza vi tinh thể, Hợp chất 2, lactoza monohydrat, và croscarmellose natri) và được trộn trong 2 phút ở 25 rpm. Tiếp theo, hỗn hợp chung được chia để tạo ra các viên nén 50 mg và 100 mg. Để tạo ra viên nén 50 mg, hỗn hợp từ bước 4 được nén bằng dụng cụ lồi chuẩn tròn 6 mm. Để tạo ra viên nén 100 mg, hỗn hợp từ bước 4 được nén bằng dụng cụ lồi chuẩn tròn 8 mm. Tiếp theo, các viên nén được đóng gói vào các lọ HDPE được hàn cảm ứng với nắp PP có chất hút ẩm.

FIG. 26 là muối hemi-sulfat có các đặc tính dược lý ưu việt so với bazơ tự do tương ứng của nó để điều trị virus HCV.

Mô tả chi tiết sáng chế

Được bộc lộ trong bản mô tả này là hợp chất, phương pháp, dược phẩm, và dạng liều rắn để điều trị cho người và động vật chủ khác bị nhiễm hoặc phơi nhiễm virus HCV bao gồm đương lượng hữu hiệu của muối hemi-sulfat của isopropyl((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(methylamino)-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninat (Hợp chất 2) như được mô tả trong bản mô

tả này, tùy ý trong chất mang được dụng. Theo một phương án, Hợp chất 2 là chất rắn vô định hình. Theo phương án khác nữa, Hợp chất 2 là chất rắn kết tinh.



Hợp chất, dược phẩm, và dạng liều có thể cũng được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh lý liên quan đến hoặc xảy ra do phơi nhiễm virus HCV. Ví dụ, hoạt chất có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh lý dương tính với kháng thể HCV và dương tính với kháng nguyên HCV, viêm gan mạn tính do virus, bệnh ung thư gan do viêm gan C tiến triển (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan), bệnh xơ gan, bệnh viêm gan C cấp tính, bệnh viêm gan C bạo phát, bệnh viêm gan C kéo dài mạn tính, và chứng mệt mỏi do kháng HCV.

Các hoạt chất và dược phẩm có thể cũng được sử dụng để điều trị loạt các kiểu gen HCV. Ít nhất sáu kiểu gen HCV riêng biệt, mỗi kiểu gen này có nhiều kiểu phụ, đã được nhận dạng toàn cầu. Các kiểu gen 1-3 thịnh hành khắp thế giới, và các kiểu gen 4, 5, và 6 bị giới hạn hơn về mặt địa lý. Kiểu gen 4 là phổ biến ở Trung Đông và châu Phi. Kiểu gen 5 chủ yếu được tìm thấy ở Nam Phi. Kiểu gen 6 thịnh hành ở Đông Nam Á. Mặc dù các kiểu gen phổ biến nhất ở Mỹ là Kiểu gen 1, việc xác định kiểu gen và kiểu phụ có thể hỗ trợ cách điều trị và thời gian điều trị. Ví dụ, các kiểu gen khác nhau đáp ứng khác nhau với các thuốc khác nhau và thời gian điều trị tối ưu thay đổi tùy thuộc vào kiểu gen bị nhiễm. Trong các kiểu gen, kiểu phụ, như Kiểu gen 1a và Kiểu gen 1b, cũng đáp ứng khác nhau với việc điều trị. Sự nhiễm một loại kiểu gen không loại trừ sự nhiễm sau đó bởi một kiểu gen khác.

Như được mô tả trong Ví dụ 22, Hợp chất 2 có hoạt tính kháng loạt HCV các kiểu gen, bao gồm các kiểu gen 1-5. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 1, HCV Kiểu gen 2, HCV Kiểu gen 3, HCV Kiểu gen 4, HCV Kiểu gen 5, hoặc HCV Kiểu gen 6. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 1a. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu

gen 1b. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 2a. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 2b. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 3a. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 4a. Theo một phương án, Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 4d.

Theo một phương án, Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 5a. Theo một phương án, Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 6a. Theo một phương án, Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 2 được sử dụng để điều trị HCV Kiểu gen 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6o, 6p, 6q, 6r, 6s, 6t, hoặc 6u.

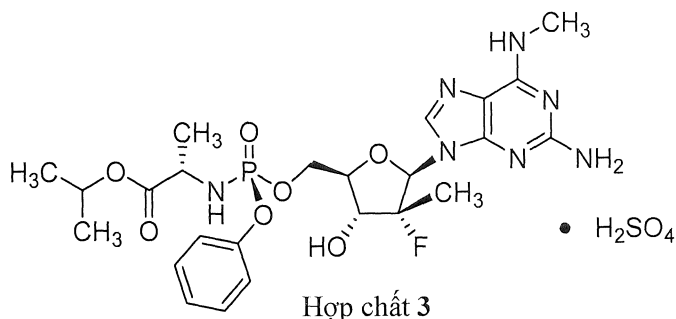
Như được bàn luận trong Ví dụ 25 và được thể hiện trên FIG. 24, nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định dự đoán ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 sau liều 450 mg (400 mg bazơ tự do) và liều 600 mg (550 mg bazơ tự do) của Hợp chất 2 là nằm trong khoảng từ 40 ng/mL đến 50 ng/mL. Mức $C_{24,ss}$ này vượt quá EC_{95} của Hợp chất 1 ở các kiểu gen HCV 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a, và 4d. Số liệu này xác nhận rằng Hợp chất 2 có hoạt tính toàn kiểu gen hiệu nghiệm. Điều này gây bất ngờ do Hợp chất 2 đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) nhỏ hơn so với nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa dạng nucleosit sofosbuvir sau khi định liều sofosbuvir tương đương. Nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa dạng nucleosit sofosbuvir là khoảng 100 ng/mL, song mức này chỉ vượt quá EC_{95} của sofosbuvir kháng các thể phân lập lâm sàng GT2 (FIG. 24). Hợp chất 2 hiệu nghiệm hơn sofosbuvir kháng GT1, GT2, GT3, và GT4, và do đó cho phép dạng liều mà phân phối nồng độ cực tiểu nhỏ hơn ở trạng thái ổn định chất chuyển hóa của nó nhưng lại có hiệu quả kháng tất cả các kiểu gen được thử nghiệm của HCV. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được chất chuyển hóa 1-7 nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) nằm trong khoảng từ 15 đến 75 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được chất chuyển hóa 1-7 nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) nằm trong khoảng từ 20 đến 60 ng/mL, 20 đến 50 ng/mL, hoặc 20 đến 40 ng/mL.

Theo một phương án, hợp chất, chế phẩm, hoặc các dạng liều rắn bao gồm hợp chất này có thể cũng được sử dụng phòng bệnh để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển

của bệnh lâm sàng ở những người dương tính với kháng thể HCV hoặc kháng nguyên HCV hoặc những người đã bộc lộ viêm gan C.

Cụ thể, đã phát hiện ra rằng Hợp chất **2** có hoạt tính kháng HCV và có các đặc tính kiểu dược chất và dược lý ưu việt so với bazơ tự do của nó (Hợp chất **1**). Ngạc nhiên là, Hợp chất **2** có độ sinh khả dụng cao hơn và đạt được AUC cao hơn Hợp chất **1** (Ví dụ 19) và Hợp chất **2** có tính chọn lọc cao hơn đối với cơ quan đích, tức là gan, so với Hợp chất **1** (Ví dụ 19).

Hợp chất **2** cũng ưu việt so với Hợp chất **1** về độ tan và độ ổn định hóa học. Điều này là bất ngờ do muối mono-sulfat của isopropyl((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat (Hợp chất **3**) không ổn định và có dạng gồm dính, trong khi Hợp chất **2**, muối hemi-sulfat, là chất rắn màu trắng ổn định. Muối hemisulfat, đều ở dạng chất rắn và ở dạng liều rắn, rất ổn định trong 9 tháng và không hút ẩm.



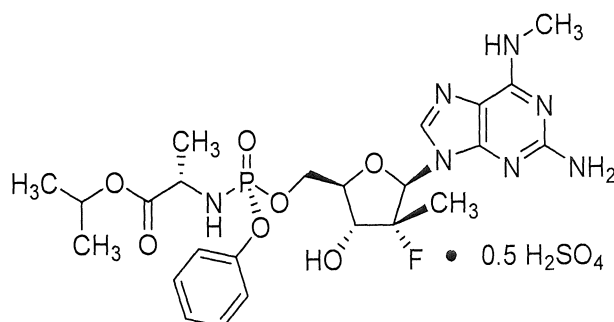
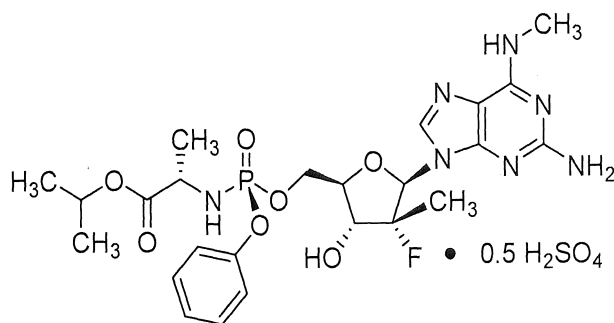
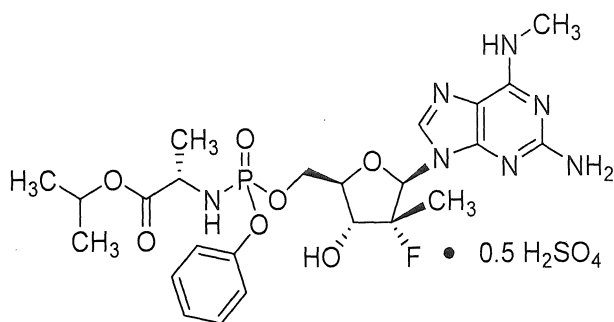
Mặc dù có nhiều tài liệu chuyên ngành và đơn sáng chế về nucleotit kháng virus, Hợp chất **2** chưa được bộc lộ cụ thể.

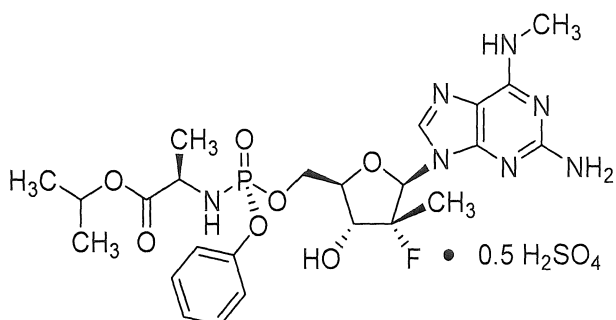
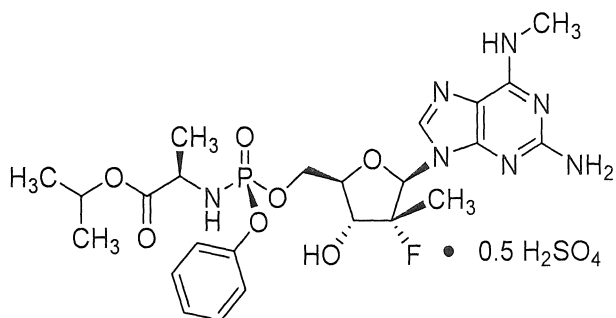
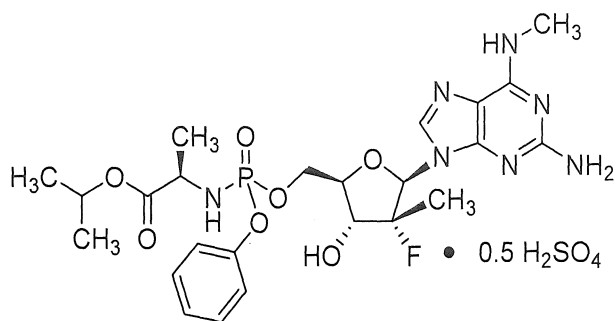
Hợp chất **2** có hóa lập thể S ở nguyên tử phospho mà điều này đã được xác nhận bằng tinh thể học tia X (FIG. 3, Ví dụ 2). Theo các phương án khác, Hợp chất **2** có thể được sử dụng ở dạng các đồng phân đối ảnh R và S ở nguyên tử phospho theo tỷ lệ mong muốn bất kỳ, bao gồm lên đến đồng phân đối ảnh tinh khiết. Theo một số phương án, Hợp chất **2** được sử dụng ở dạng mà ít nhất 90% không chứa chất đồng phân đối ảnh đối lập, và có thể là ít nhất 98%, 99%, hoặc thậm chí 100% không chứa chất đồng phân đối ảnh đối lập. Trừ khi có quy định khác, Hợp chất **2** giàu đồng phân đối ảnh là ít nhất 90% không chứa chất đồng phân đối ảnh đối lập. Ngoài ra, theo phương án khác, axit amin

của phosphoramidat có thể ở cấu hình D hoặc L, hoặc hỗn hợp của nó, bao gồm hỗn hợp raxemic.

Trừ khi có quy định khác, các hợp chất được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất ở cấu hình β -D. Theo phương án khác, các hợp chất có thể được đề xuất ở cấu hình β -L. Tương tự, nhóm thế bất kỳ có tính bất đối có thể được đề xuất ở dạng raxemic, đồng phân đối ảnh, đồng phân không đối quang, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng. Khi phosphoramidat có tính bất đối, nó có thể được đề xuất dưới dạng dẫn xuất phospho bất đối R hoặc S hoặc hỗn hợp của nó, bao gồm hỗn hợp raxemic. Tất cả các hỗn hợp cấu hình không gian này là các phương án khác của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, ít nhất một trong số các hydro của Hợp chất 2 (nucleotit hoặc muối hemi-sulfat) có thể được thay bằng đơteri.

Các cấu hình khác này bao gồm, nhưng không giới hạn ở,





I. Muối hemi-sulfat của isopropyl((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat (Hợp chất **2**)

Hoạt chất theo sáng chế là Hợp chất **2**, có thể được đề xuất dưới dạng hợp phần được dụng hoặc dạng liều rắn của nó. Theo một phương án, Hợp chất **2** là chất rắn vô định hình. Theo phương án khác nữa, Hợp chất **2** là chất rắn kết tinh (dạng tinh thể).

Tổng hợp hợp chất **2**

Sáng chế còn bao gồm quy trình, được minh họa không giới hạn, điều chế Hợp chất **2** bao gồm các bước:

- (i) hòa tan Hợp chất **1** trong dung môi hữu cơ, ví dụ, axeton, etyl axetat, metanol, axetonitril, hoặc ete, hoặc dạng tương tự, trong bình tam giác hoặc vật chứa;

- (ii) nạp dung môi hữu cơ thứ hai vào bình tam giác hoặc vật chứa thứ hai, có thể giống hoặc khác với dung môi hữu cơ trong bước (i), tùy ý làm lạnh dung môi thứ hai xuống đến 0-10 độ C, và bổ sung bằng cách nhỏ giọt H_2SO_4 vào dung môi hữu cơ thứ hai tạo ra hỗn hợp H_2SO_4 /dung môi hữu cơ; và trong đó dung môi ví dụ có thể là metanol;
- (iii) bổ sung bằng cách nhỏ giọt hỗn hợp H_2SO_4 /dung môi ở tỷ lệ mol 0,5/1,0 từ bước (ii) vào dung dịch chứa Hợp chất 1 của bước (i) ở nhiệt độ môi trường hoặc tăng hoặc giảm đôi chút (ví dụ 23-35 độ C);
- (iv) khuấy hỗn hợp phản ứng của bước (iii) cho đến khi kết tủa của Hợp chất 2 được tạo ra, ví dụ, ở nhiệt độ môi trường hoặc tăng hoặc giảm đôi chút;
- (v) tùy ý lọc kết tủa thu được từ bước (iv) và rửa bằng dung môi hữu cơ; và
- (vi) tùy ý sấy khô Hợp chất 2 thu được trong chân không, tùy ý ở nhiệt độ gia tăng, ví dụ, 55, 56, 57, 58, 59, hoặc 60 °C.

Theo một số phương án, bước (i) trên đây được thực hiện trong axeton. Ngoài ra, dung môi hữu cơ thứ hai trong bước (ii) có thể là ví dụ metanol và hỗn hợp dung môi hữu cơ trong bước (v) là metanol/axeton.

Theo một phương án, Hợp chất 1 được hòa tan trong etyl axetat trong bước (i). Theo một phương án, Hợp chất 1 được hòa tan trong tetrahydrofuran trong bước (i). Theo một phương án, Hợp chất 1 được hòa tan trong axetonitril trong bước (i). Theo phương án khác, Hợp chất 1 được hòa tan trong dimethylformamit trong bước (i).

Theo một phương án, dung môi hữu cơ thứ hai trong bước (ii) là etanol. Theo một phương án, dung môi hữu cơ thứ hai trong bước (ii) là isopropanol. Theo một phương án, dung môi hữu cơ thứ hai trong bước (ii) là *n*-butanol.

Theo một phương án, hỗn hợp dung môi được sử dụng để rửa trong bước (v), ví dụ, etanol/axeton. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là isopropanol/axeton. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là *n*-butanol/axeton. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là etanol/etyl axetat. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là isopropanol/etyl axetat. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là *n*-butanol/etyl axetat. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là etanol/

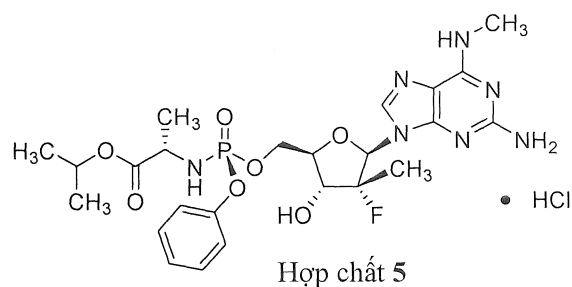
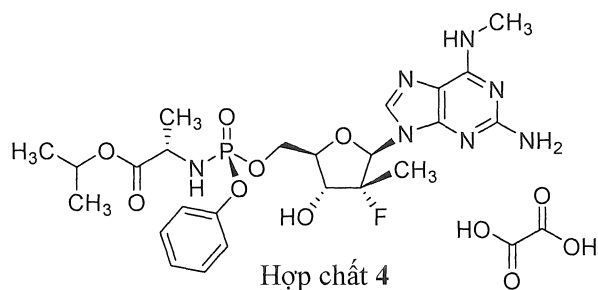
tetrahydrofuran. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là isopropanol/ tetrahydrofuran. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là n-butanol/ tetrahydrofuran. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là ethanol/ axetonitril. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là isopropanol/ axetonitril. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là n-butanol/ axetonitril. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là ethanol/ dimethylformamit. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là isopropanol/ dimethylformamit. Theo một phương án, hỗn hợp dung môi rửa trong bước (v) là n-butanol/ dimethylformamit.

II. Chuyển hóa Isopropyl((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat (Hợp chất 2)

Chuyển hóa Hợp chất 1 và Hợp chất 2 bao gồm tạo ra 5'-monophosphat và tiếp theo đồng hóa bazơ N⁶-metyl-2,6-diaminopurin (1-3) tạo ra ((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metyl dihydro phosphat (1-4) dưới dạng 5'-monophosphat. Tiếp theo, monophosphat được đồng hóa tiếp thành loại triphosphat hoạt tính: 5'-triphosphat (1-6). 5'-triphosphat có thể được chuyển hóa tiếp tạo ra 2-amino-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-flo-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-metyltetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (1-7). Theo cách khác, 5'-monophosphat 1-2 có thể được chuyển hóa tạo ra bazơ purin 1-8. Con đường chuyển hóa đối với isopropyl((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat được minh họa trong Sơ đồ 1 (được thể hiện trên đây).

III. Muối bổ sung của Hợp chất 1

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất Hợp chất 1 dưới dạng muối oxalat (Hợp chất 4) hoặc muối HCl (Hợp chất 5).



Cả hai muối oxalat 1:1 và muối HCl 1:1 đều tạo ra các chất rắn có các đặc tính hợp lý cho các dạng liều rắn để điều trị vật chủ như người bị viêm gan C. Tuy nhiên, muối oxalat có thể ít được yêu cầu, và có lẽ là không thích hợp, nếu bệnh nhân dễ bị sỏi thận. Muối HCl có tính hút ẩm cao hơn so với muối hemisulfat. Do đó, muối hemisulfat vẫn là dạng muối cần có nhất của Hợp chất 1 với các đặc tính bất ngờ.

IV. Các định nghĩa

Thuật ngữ "cấu hình D" như được sử dụng theo ngữ cảnh của sáng chế chỉ cấu hình nguyên tắc mô phỏng cấu hình tự nhiên của các gốc đường trái với các nucleosit không có trong tự nhiên hoặc cấu hình "L". Thuật ngữ " β " hoặc " β anome" được dùng để chỉ các chất tương tự nucleosit trong đó bazơ nucleosit được cấu hình (được sắp xếp) bên trên mặt phẳng của gốc furanoza trong chất tương tự nucleosit.

Các thuật ngữ "dùng kết hợp" và "việc dùng kết hợp" hoặc liệu pháp kết hợp được dùng để mô tả việc dùng Hợp chất 2 theo sáng chế kết hợp với ít nhất một hoạt chất khác, ví dụ, nếu thích hợp, ít nhất một chất kháng HCV bổ sung. Việc định thời cho việc dùng kết hợp tốt nhất là được xác định bởi chuyên gia y tế điều trị bệnh nhân. Đôi khi tốt hơn nếu các chất được dùng đồng thời. Theo cách khác, các dược chất được chọn cho liệu pháp kết hợp có thể được dùng ở các thời điểm khác nhau cho bệnh nhân. Tất nhiên, khi xuất hiện nhiều hơn một bệnh nhiễm virus hoặc bệnh nhiễm trùng khác hoặc tình trạng bệnh lý khác, các hợp chất có mặt có thể được kết hợp với các chất khác để điều trị bệnh nhiễm trùng khác hoặc tình trạng bệnh lý khác này nếu cần.

Thuật ngữ "vật chủ", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ sinh vật đơn bào hoặc đa bào trong đó virus HCV có thể sao chép, bao gồm các dòng tế bào và các động vật, và thường là người. Cụ thể, thuật ngữ vật chủ chỉ tế bào bị nhiễm, tế bào được chuyển nhiễm bằng toàn bộ hoặc một phần hệ gen của HCV, và động vật, cụ thể là động vật linh

trường (bao gồm hắc tinh tinh) và người. Trong hầu hết các ứng dụng trên động vật theo sáng chế, vật chủ là người bệnh. Tuy nhiên, các ứng dụng trong thú y, trong một số chỉ định, được sáng chế chỉ rõ (như hắc tinh tinh). Ví dụ, vật chủ có thể là bò, ngựa, chim, chó, mèo, v.v..

Thay thế bằng đồng vị

Sáng chế bao gồm các hợp chất và ứng dụng của Hợp chất 2 có các thay thế nguyên tử đồng vị mong muốn với lượng lớn hơn lượng dư thừa tự nhiên của đồng vị, tức là, được làm giàu. Các đồng vị là các nguyên tử có cùng số lượng nguyên tử nhưng khác nhau về số khối, tức là, cùng số lượng proton nhưng khác nhau về số lượng neutron. Ví dụ và không giới hạn, các đồng vị của hydro, ví dụ, đơteri (^2H) và triti (^3H), có thể được sử dụng ở vị trí bất kỳ trong các cấu trúc được mô tả. Theo cách khác hoặc ngoài ra, các đồng vị của cacbon, ví dụ, ^{13}C và ^{14}C , có thể được sử dụng. Sự thế đồng vị được ưu tiên là đơteri cho hydro ở một hoặc nhiều vị trí trên phân tử để cải thiện hiệu năng của dược chất. Đơteri có thể được liên kết ở vị trí phá vỡ liên kết trong khi chuyển hóa (tác dụng đồng vị động học của α -đơteri) hoặc cạnh hoặc gần vị trí phá vỡ liên kết (tác dụng đồng vị động học của β -đơteri). Achillion Pharmaceuticals, Inc. (WO/2014/169278 và WO/2014/169280) mô tả việc đơteri hóa các nucleotit để cải thiện dược động học hoặc dược lực học của chúng, bao gồm ở vị trí 5 của phân tử.

Việc thế bằng các đồng vị như đơteri có thể tạo ra một số lợi ích điều trị nhờ độ ổn định chuyển hóa cao hơn, như, ví dụ, thời gian bán hủy in vivo tăng hoặc yêu cầu liều lượng giảm. Việc thế đơteri cho hydro ở vị trí phá vỡ liên kết trong khi chuyển hóa có thể làm giảm tỷ lệ hoặc loại bỏ chuyển hóa ở liên kết đó. Ở vị trí bất kỳ của hợp chất mà một nguyên tử hydro có thể có mặt, nguyên tử hydro này có thể là đồng vị bất kỳ của hydro, bao gồm proti (^1H), đơteri (^2H) và triti (^3H). Do đó, tham chiếu đến hợp chất bao hàm tất cả các dạng đồng vị có thể có trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ chất tương tự "được đánh dấu bằng đồng vị" chỉ "chất tương tự đơteri hóa", "chất tương tự được đánh dấu bằng ^{13}C " hoặc "chất tương tự được đơteri hóa/được đánh dấu bằng ^{13}C ". Thuật ngữ "chất tương tự được đơteri hóa" có nghĩa là hợp chất được mô tả trong bản mô tả này, nhờ đó một đồng vị của H, tức là, hydro/proti (^1H), được thế bằng đồng vị của H, tức là, đơteri (^2H). Thế đơteri có thể là một phần hoặc hoàn toàn. Thế đơteri một phần có nghĩa là ít nhất một hydro được thế bằng ít nhất một đơteri. Theo

một số phương án, đồng vị được làm giàu 90, 95 hoặc 99% hoặc nhiều hơn trong một đồng vị ở vị trí nghiên cứu. Theo một số phương án, đơteri được làm giàu 90, 95 hoặc 99% ở vị trí mong muốn. Trừ khi có quy định khác, đơteri hóa là ít nhất 80% ở vị trí đã chọn. Việc đơteri hóa nucleosit có thể xảy ra ở hydro thay thế được bất kỳ mà tạo ra kết quả mong muốn.

V. Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa

Điều trị, như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ việc dùng Hợp chất 2 cho vật chủ, ví dụ, người bị hoặc có thể sẽ bị nhiễm virus HCV.

Thuật ngữ “phòng ngừa” hoặc ngăn ngừa, khi được sử dụng, chỉ việc dùng Hợp chất 2 để ngăn ngừa hoặc làm giảm khả năng xuất hiện rối loạn do virus. Sáng chế bao gồm cả hai liệu pháp điều trị và phòng ngừa hoặc ngăn ngừa. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng cho vật chủ đã phơi nhiễm và do đó có nguy cơ bị bệnh nhiễm virus viêm gan C.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa virus viêm gan C, bao gồm các dạng kháng thuốc và kháng đa thuốc của HCV và các tình trạng bệnh liên quan, các tình trạng bệnh lý, hoặc các biến chứng của bệnh nhiễm HCV, bao gồm bệnh xơ gan và các tình trạng ngộ độc gan liên quan, cũng như các tình trạng bệnh lý khác do bệnh nhiễm HCV, như suy nhược, chán ăn, sút cân, to ngực (nhất là ở nam giới), phát ban (nhất là ở lòng bàn tay), khó đông máu, mạch máu kiểu mạng nhện trên da, lú lẫn, hôn mê (bệnh não), tụ dịch trong ổ bụng (cổ trướng), giãn tĩnh mạch thực quản, tăng áp lực tĩnh mạch cửa, suy thận, to lách, giảm tế bào máu, thiếu máu, giảm tiểu cầu, vàng da, và bệnh ung thư tế bào gan, v.v.. Phương pháp này bao gồm cho vật chủ có nhu cầu này, thường là người, dùng lượng hữu hiệu của Hợp chất 2 như được mô tả trong bản mô tả này, tùy ý kết hợp với ít nhất một hoạt chất sinh học bổ sung, ví dụ, chất kháng HCV bổ sung, kết hợp tiếp với chất mang được dùng, chất phụ gia và/hoặc tá dược.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc phòng ngừa bệnh nhiễm HCV hoặc tình trạng bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan hoặc tình trạng bệnh thứ cấp, tình trạng hoặc biến chứng của bệnh nhiễm HCV, bao gồm bệnh xơ gan và các tình trạng ngộ độc gan liên quan, suy nhược, chán ăn, sút cân, to ngực (nhất là ở nam giới), phát ban (nhất là ở lòng bàn tay), khó đông máu, mạch máu kiểu mạng nhện trên da, lú lẫn, hôn mê (bệnh não), tụ dịch trong ổ bụng (cổ trướng), giãn tĩnh mạch

thực quản, tăng áp lực tĩnh mạch cửa, suy thận, to lách, giảm tế bào máu, thiếu máu, giảm tiểu cầu, vàng da, và bệnh ung thư (gan) tế bào gan, v.v., phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân có nguy cơ dùng lượng hữu hiệu của Hợp chất 2 như được mô tả trên đây kết hợp với chất mang được dụng, chất phụ gia, hoặc tá dược, tùy ý kết hợp với tác nhân kháng HCV bổ sung. Theo phương án khác, các hoạt chất theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân sau khi cấy ghép gan liên quan đến viêm gan để bảo vệ cơ quan mới này.

Theo phương án khác, Hợp chất 2 được đề xuất dưới dạng muối hemisulfat của phosphoramidat của Hợp chất 1 không phải phosphoramidat cụ thể được mô tả trong phần minh họa hợp chất. Nhiều phosphoramidat được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ bao gồm các este và phospho-este, dạng kết hợp bất kỳ của chúng có thể được sử dụng để tạo ra hoạt chất như được mô tả trong bản mô tả này ở dạng muối hemisulfat.

VI. Các dược phẩm và các dạng liều

Theo một khía cạnh của sáng chế, dược phẩm theo sáng chế bao gồm lượng có tác dụng kháng virus HCV của Hợp chất 2 như được mô tả trong bản mô tả này, tùy ý kết hợp với chất mang được dụng, chất phụ gia, hoặc tá dược, còn tùy ý kết hợp với hoặc xen kẽ ít nhất một hoạt chất khác. Theo một phương án, sáng chế bao gồm dạng liều rắn của Hợp chất 2 trong chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh của sáng chế, dược phẩm theo sáng chế bao gồm lượng có tác dụng kháng HCV của Hợp chất 2 được mô tả trong bản mô tả này, tùy ý kết hợp với chất mang được dụng, chất phụ gia, hoặc tá dược, còn tùy ý kết hợp với ít nhất một chất kháng virus khác, như chất kháng HCV.

Sáng chế bao gồm dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu để điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C của Hợp chất 2 theo sáng chế hoặc tiền dược chất, trong chất mang được dụng hoặc tá dược. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu để ngăn ngừa bệnh nhiễm virus viêm gan C của Hợp chất 2 theo sáng chế hoặc tiền dược chất, trong chất mang được dụng hoặc tá dược.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng lượng có hiệu quả điều trị sẽ thay đổi theo bệnh nhiễm hoặc tình trạng bệnh lý được điều trị, mức độ nghiêm trọng của nó, chế độ điều trị được sử dụng, dược động học của chất được sử dụng, cũng như bệnh nhân hoặc đối tượng (động vật hoặc người) được điều trị, và lượng điều trị như vậy có thể được xác định bởi bác sĩ trực hoặc chuyên viên.

Hợp chất 2 theo sáng chế có thể được pha chế kết hợp với chất mang dược dụng. Nói chung, tốt hơn nếu dùng dược phẩm ở dạng có thể dùng qua đường miệng, cụ thể, dạng liều rắn như viên tròn hoặc viên nén. Một số chế phẩm có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong cơ, khu trú, qua da, qua đường má, dưới da, thuốc đạn, hoặc đường khác, bao gồm xịt vào mũi. Các chế phẩm dùng qua đường trong tĩnh mạch và trong cơ thường được dùng trong nước muối vô trùng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể cải biến các chế phẩm này làm cho chúng dễ tan hơn trong nước hoặc trong chất dẫn khác, ví dụ, việc này có thể dễ dàng thực hiện được bằng các cải biến nhỏ (pha chế với muối, este hóa, v.v.) mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể cải biến đường dùng và chế độ liều của Hợp chất 2 nhằm kiểm soát dược động học của hợp chất theo sáng chế để đạt được tác dụng có lợi tối đa ở bệnh nhân, như được mô tả chi tiết trong bản mô tả này.

Trong một số dạng liều, dạng tiền dược chất của các hợp chất, nhất là bao gồm các dẫn xuất axyl hóa (axetyl hóa hoặc dạng khác), và ete (alkyl và dạng liên quan), phosphat este, thiophosphoramidat, phosphoramidat, và các dạng muối khác nhau của hợp chất theo sáng chế, có thể được sử dụng để đạt được tác dụng mong muốn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách dễ dàng cải biến các hợp chất hiện tại thành các dạng tiền dược chất để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân phối các hoạt chất đến vị trí đích bên trong sinh vật chủ hoặc bệnh nhân. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ tận dụng các thông số dược động học hợp lý của các dạng tiền dược chất, nếu cần, trong việc phân phối các hợp chất hiện tại đến vị trí đích bên trong sinh vật chủ hoặc bệnh nhân để tối đa hóa tác dụng dự tính của hợp chất.

Lượng Hợp chất 2 chứa trong dược phẩm theo sáng chế là lượng hữu hiệu để đạt được kết quả mong muốn theo sáng chế, ví dụ, để điều trị bệnh nhiễm HCV, làm giảm khả năng nhiễm HCV hoặc ức chế, làm giảm, và/hoặc loại bỏ HCV hoặc các tác dụng thứ cấp của nó, bao gồm các tình trạng bệnh, các tình trạng bệnh lý, và/hoặc các biến chứng xảy ra do HCV. Nói chung, lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất theo sáng chế trong dược phẩm dạng liều có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 mg/kg đến khoảng 100 mg/kg mỗi ngày hoặc nhiều hơn, thường là nhỏ hơn không đáng kể so với khoảng 0,1 mg/kg đến lớn hơn khoảng 25 mg/kg mỗi ngày theo thể trọng của bệnh nhân hoặc nhiều hơn đáng kể, tùy thuộc vào hợp chất được sử dụng, tình trạng bệnh lý hoặc bệnh

nhiễm trùng được điều trị và đường dùng. Hợp chất 2 thường được dùng với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/kg đến khoảng 15 mg/kg mỗi ngày theo thể trọng của bệnh nhân, tùy thuộc vào dược động học của chất ở bệnh nhân. Giới hạn liều lượng này thường tạo ra nồng độ hoạt chất trong máu hữu hiệu mà có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100, từ 0,05 đến 100 microgam/cc máu ở bệnh nhân.

Thông thường, để điều trị, ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự khởi phát của các bệnh nhiễm trùng này và/hoặc để làm giảm khả năng nhiễm HCV, hoặc tình trạng bệnh thứ cấp, tình trạng hoặc biến chứng của HCV, Hợp chất 2 sẽ được dùng ở dạng liều rắn với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 250 microgam lên đến khoảng 800 miligam hoặc hơn ít nhất một lần/ngày, ví dụ, ít nhất khoảng 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, hoặc 800 miligam hoặc nhiều hơn, một lần, hai lần, ba lần, hoặc lên đến bốn lần/ngày theo hướng dẫn của nhà cung cấp y tế. Hợp chất 2 thường được dùng qua đường miệng, nhưng có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, khu trú, hoặc ở dạng thuốc đạn, cũng như qua đường trong mũi, dưới dạng thuốc xịt mũi hoặc theo đường khác như được mô tả trong bản mô tả này. Thường xuyên là, Hợp chất 2 có thể được dùng ở dạng viên nén, viên nang, thuốc tiêm, chế phẩm dùng qua đường trong tĩnh mạch, huyền phù, chất lỏng, nhũ tương, thể cấy, hạt, dạng cầu, kem, thuốc mỡ, thuốc đạn, dạng xông được, dạng qua da, qua đường má, dưới lưỡi, khu trú, gel, màng nhầy, và dạng tương tự.

Khi dạng liều trong bản mô tả này là liều miligam trọng lượng, nó chỉ lượng Hợp chất 2 (tức là, trọng lượng của muối hemi-sulfat) trừ khi có quy định khác.

Theo một số phương án, dược phẩm ở dạng liều mà chứa từ khoảng 1 mg đến khoảng 2000 mg, từ khoảng 10 mg đến khoảng 1000 mg, từ khoảng 100 mg đến khoảng 800 mg, từ khoảng 200 mg đến khoảng 600 mg, từ khoảng 300 mg đến khoảng 500 mg, hoặc từ khoảng 400 mg đến khoảng 450 mg của Hợp chất 2 ở dạng liều đơn vị. Theo một số phương án, dược phẩm ở dạng liều, ví dụ ở dạng liều rắn, mà chứa lên đến khoảng 10, khoảng 50, khoảng 100, khoảng 125, khoảng 150, khoảng 175, khoảng 200, khoảng 225, khoảng 250, khoảng 275, khoảng 300, khoảng 325, khoảng 350, khoảng 375, khoảng 400, khoảng 425, khoảng 450, khoảng 475, khoảng 500, khoảng 525, khoảng 550, khoảng 575, khoảng 600, khoảng 625, khoảng 650, khoảng 675, khoảng 700, khoảng 725, khoảng 750, khoảng 775, khoảng 800, khoảng 825, khoảng 850, khoảng 875,

khoảng 900, khoảng 925, khoảng 950, khoảng 975, hoặc khoảng 1000 mg hoặc more của Hợp chất 2 ở dạng liều đơn vị. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà phân phối ít nhất khoảng 300 mg. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà phân phối ít nhất khoảng 400 mg. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà phân phối ít nhất khoảng 500 mg. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà phân phối ít nhất khoảng 600 mg. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà phân phối ít nhất khoảng 700 mg. Theo một phương án, Hợp chất 2 được dùng ở dạng liều mà phân phối ít nhất khoảng 800 mg. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 12 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 10 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 8 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 4 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian ít nhất 4 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian ít nhất 6 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian ít nhất 8 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian ít nhất 10 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian ít nhất 12 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất cách nhật trong thời gian lên đến 12 tuần, lên đến 10 tuần, lên đến 8 tuần, lên đến 6 tuần, hoặc lên đến 4 tuần. Theo một số phương án, Hợp chất 2 được dùng ít nhất cách nhật trong thời gian ít nhất 4 tuần, ít nhất 6 tuần, ít nhất 8 tuần, ít nhất 10 tuần, hoặc ít nhất 12 tuần. Theo một phương án, ít nhất khoảng 600 mg của Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần. Theo một phương án, ít nhất khoảng 500 mg của Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần. Theo một phương án, ít nhất khoảng 400 mg của Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần. Theo một phương án, ít nhất 300 mg của Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần. Theo một phương án, ít nhất 200 mg của Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần. Theo một phương án, ít nhất 100 mg của Hợp chất 2 được dùng ít nhất một lần/ngày trong thời gian lên đến 6 tuần.

Chất chuyển hóa 1-6 là triphosphat hoạt tính của Hợp chất 2, nhưng chất chuyển hóa 1-6 không thể đo được trong huyết tương. Đại diện cho chất chuyển hóa 1-6 là chất chuyển hóa 1-7. Chất chuyển hóa 1-7 là chất chuyển hóa dạng nucleosit có thể đo được trong huyết tương và do đó là chỉ thị nồng độ nội bào của chất chuyển hóa 1-6. Để có hoạt tính kháng virus HCV cực đại, dạng liều của Hợp chất 2 phải đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 vượt quá giá trị EC_{95} của Hợp chất 2. Như được thể hiện trên FIG. 24, EC_{95} của Hợp chất 1 kháng các thể phân lập lâm sàng của GT1, GT2, GT3, và GT4 là nhỏ hơn 25 ng/mL (các giá trị EC_{95} của Hợp chất 1 và EC_{95} của Hợp chất 2 EC_{95} là như nhau). Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 15 đến 75 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20 đến 60 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 30 đến 60 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20 đến 50 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 30 đến 50 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20 đến 45 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20 đến 30 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20 đến 35 ng/mL. Theo một phương án, dạng liều của Hợp chất 2 được phân phối để đạt được nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 20 đến 25 ng/mL. Dạng liều gần đúng là $\pm 10\%$ nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định.

Theo một phương án, Hợp chất 2 được định liều ở lượng mà đạt AUC (area under the curve: vùng dưới đường cong) của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 1.200 đến 3.000 ng/mL. Theo một phương án, Hợp chất 2 được định liều ở lượng mà đạt AUC

của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 1.500 đến 3.000 ng/mL. Theo một phương án, Hợp chất 2 được định liều ở lượng mà đạt AUC của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 1.800 đến 3.000 ng/mL. Theo một phương án, Hợp chất 2 được định liều ở lượng mà đạt AUC của chất chuyển hóa 1-7 nằm trong khoảng từ 2.100 đến 3.000 ng/mL. Theo phương án ưu tiên, Hợp chất 2 được định liều ở lượng mà đạt được AUC của chất chuyển hóa 1-7 khoảng 2.200 ng*h/mL. Dạng liều gần đúng là $\pm 10\%$ AUC.

Trong trường hợp dùng đồng thời Hợp chất 2 kết hợp với hợp chất kháng HCV khác như được mô tả trong bản mô tả này, lượng Hợp chất 2 theo sáng chế được dùng nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 mg/kg theo thể trọng của bệnh nhân đến khoảng 800 mg/kg hoặc hơn theo thể trọng của bệnh nhân hoặc nhiều hơn đáng kể, tùy thuộc vào chất thứ hai được dùng kết hợp và hiệu quả kháng virus của nó, tình trạng của bệnh nhân và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc bệnh nhiễm được điều trị và đường dùng. Chất kháng HCV khác có thể, ví dụ, được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 800 mg/kg. Các ví dụ về liều lượng của hoạt chất thứ hai là lượng nằm trong khoảng từ 250 microgam lên đến 750 mg hoặc hơn, ít nhất một lần/ngày, ví dụ, ít nhất khoảng 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, hoặc 800 miligam hoặc nhiều hơn, lên đến bốn lần/ngày. Theo một số phương án ưu tiên, Hợp chất 2 có thể thường được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 mg/kg đến 50 mg/kg hoặc nhiều hơn (thường lên đến khoảng 100 mg/kg), nói chung tùy thuộc vào dược động học của hai chất này ở bệnh nhân. Giới hạn liều lượng này thường tạo ra nồng độ hoạt chất trong máu hữu hiệu ở bệnh nhân.

Nhằm mục đích của sáng chế, lượng có tác dụng phòng bệnh hoặc ngăn ngừa của các chế phẩm theo sáng chế nằm trong cùng giới hạn nồng độ như nêu trên đây đối với lượng có hiệu quả điều trị và thường là giống như lượng có hiệu quả điều trị.

Việc dùng Hợp chất 2 có thể là dùng liên tục (túi truyền tĩnh mạch) đến vài lần dùng qua đường miệng hoặc trong mũi/ngày (ví dụ, Q.I.D.) hoặc dùng qua da và có thể bao gồm dùng qua đường miệng, khu trú, ngoài đường tiêu hóa, trong cơ, trong tĩnh mạch, dưới da, qua da (có thể bao gồm chất tăng cường tính thấm), qua đường má, và thuốc đạn, bên cạnh các đường dùng khác. Viên nén dùng qua đường miệng có lớp bao ăn được có thể cũng được sử dụng để tăng cường độ sinh khả dụng của các hợp chất để dùng qua đường miệng. Dạng liều có hiệu quả nhất sẽ phụ thuộc vào độ sinh khả

dụng/dược động học của chất cụ thể được chọn cũng như mức độ nghiêm trọng ở bệnh nhân. Dạng liều dùng qua đường miệng được đặc biệt ưu tiên, do dễ dùng và bệnh nhân tuân thủ tốt về sau.

Để sản xuất dược phẩm theo sáng chế, lượng có hiệu quả điều trị của Hợp chất 2 theo sáng chế thường được trộn đều với chất mang dược dụng theo các kỹ thuật pha thuốc thông thường để tạo ra liều. Chất mang có thể có nhiều dạng tùy thuộc vào dạng dược phẩm cần dùng, ví dụ, qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Để bào chế dược phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, môi trường dược thông thường bất kỳ có thể được sử dụng. Do đó, đối với các dược phẩm lỏng dùng qua đường miệng như huyền phù, cồn ngọt, và dung dịch, các chất mang và chất phụ gia thích hợp bao gồm nước, glycol, dầu, rượu, chất điều vị, chất bảo quản, chất tạo màu, và dạng tương tự có thể được sử dụng. Đối với các dược phẩm rắn dùng qua đường miệng như bột, viên nén, viên nang, và đối với các dược phẩm rắn như thuốc đạn, các chất mang và chất phụ gia thích hợp bao gồm tinh bột, chất mang đường, như dextroza, manifold, lactoza, và các chất mang liên quan, chất pha loãng, chất tạo hạt, chất làm trơn, chất liên kết, chất gây rã, và dạng tương tự có thể được sử dụng. Nếu cần, viên nén hoặc viên nang có thể có lớp bao tan trong ruột hoặc giải phóng ổn định bằng các kỹ thuật chuẩn. Việc sử dụng các dạng liều này có thể tăng cường đáng kể độ sinh khả dụng của các hợp chất ở bệnh nhân.

Đối với các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, chất mang sẽ thường bao gồm nước vô trùng hoặc dung dịch nước natri clorua, mặc dù các thành phần khác, bao gồm các thành phần hỗ trợ phân tán, cũng có thể được bao gồm. Tất nhiên, khi nước vô trùng được sử dụng và duy trì dưới dạng vô trùng, dược phẩm và chất mang cũng phải vô trùng. Huyền phù tiêm có thể cũng được điều chế, trong trường hợp này chất mang lỏng thích hợp, chất tạo huyền phù, và dạng tương tự có thể được sử dụng.

Huyền phù liposom (bao gồm các liposom hướng đích kháng nguyên của virut) có thể cũng được điều chế bằng các phương pháp thông thường để tạo ra chất mang dược dụng. Chất mang này có thể là thích hợp để phân phối các nucleosit tự do, các nucleosit axyl/alkyl hoặc các tiền dược chất phosphat este của các hợp chất nucleosit theo sáng chế.

Theo các phương án điển hình của sáng chế, Hợp chất 2 và dược phẩm được mô tả được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa hoặc trì hoãn bệnh nhiễm HCV hoặc tình trạng bệnh thứ cấp, tình trạng bệnh lý hoặc biến chứng của HCV.

VII. Liệu pháp kết hợp và xen kẽ

Biết rõ rằng các biến thể kháng thuốc của virus có thể xuất hiện sau khi điều trị kéo dài bằng chất kháng virus. Đôi khi, sự kháng thuốc xảy ra do đột biến của gen mã hóa enzym được sử dụng trong quá trình sao chép của virus. Hiệu quả của thuốc kháng bệnh nhiễm HCV, có thể được kéo dài, tăng cường, hoặc phục hồi bằng cách dùng hợp chất kết hợp với hoặc xen kẽ hợp chất kháng virus khác, và có lẽ thậm chí hai hoặc ba hợp chất kháng virus khác mà tạo ra đột biến khác hoặc tác động qua con đường khác, so với đột biến hoặc con đường của thuốc gốc. Theo cách khác, dược động học, phân bố sinh học, thời gian bán hủy, hoặc thông số khác của thuốc có thể được biến đổi bằng liệu pháp kết hợp như vậy (có thể bao gồm liệu pháp xen kẽ nếu được coi là có dự tính). Do Hợp chất 2 được bộc lộ là chất ức chế polymeraza NS5B, có thể hữu ích nếu dùng hợp chất cho vật chủ kết hợp với, ví dụ,

- (1) chất ức chế proteaza, như chất ức chế proteaza NS3/4;
 - (2) chất ức chế NS5A;
 - (3) Chất ức chế polymeraza NS5B khác;
 - (4) Chất ức chế NS5B phi cơ chất;
 - (5) Interferon alfa-2a, chất này có thể được pegyl hóa hoặc được cải biến, và/hoặc ribavirin;
 - (6) Chất ức chế trên cơ sở phi cơ chất;
 - (7) Chất ức chế helicaza;
 - (8) Oligodeoxynucleotit đối nghĩa (S-ODN);
 - (9) Aptame;
 - (10) Ribozym kháng nucleaza;
 - (11) ARN nhiễu, bao gồm ARN nhỏ và ARN nhiễu ngắn;
 - (12) Kháng thể, kháng thể một phần hoặc kháng thể vùng kháng virus,
- hoặc

(13) Kháng nguyên hoặc kháng nguyên một phần của virus mà tạo ra đáp ứng kháng thể ở vật chủ.

Các ví dụ không giới hạn về chất kháng HCV mà có thể được dùng kết hợp với Hợp chất 2 theo sáng chế, riêng rẽ hoặc với nhiều thuốc từ danh mục này, là

- (i) Chất ức chế proteaza như telaprevir (Incivek®), boceprevir (Victrelis™), simeprevir (Olysio™), paritaprevir (ABT-450), glecaprevir (ABT-493), ritonavir (Norvir), ACH-2684, AZD-7295, BMS-791325, danoprevir, Filibuvir, GS-9256, GS-9451, MK-5172, Setrobuvir, Sovaprevir, Tegobuvir, VX-135, VX-222, và, ALS-220;
- (ii) Chất ức chế NS5A như ACH-2928, ACH-3102, IDX-719, daclatasvir, ledipasvir, velpatasvir (Epclusa), elbasvir (MK-8742), grazoprevir (MK-5172), và Ombitasvir (ABT-267);
- (iii) Chất ức chế NS5B như AZD-7295, Clemizole, dasabuvir (Exviera), ITX-5061, PPI-461, PPI-688, sofosbuvir (Sovaldi®), MK-3682, và mericitabine;
- (iv) Chất ức chế NS5B như ABT-333, và MBX-700;
- (v) Kháng thể như GS-6624;
- (vi) Thuốc kết hợp như Harvoni (ledipasvir/sofosbuvir); Viekira Pak (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir/dasabuvir); Viekirax (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir); G/P (paritaprevir và glecaprevir); Technivie (ombitasvir/ paritaprevir/ritonavir) và Epclusa (sofosbuvir/velpatasvir) và Zepatier (elbasvir và grazoprevir).

Nếu hợp chất 2 được dùng để điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C tiến triển dẫn đến bệnh ung thư gan hoặc bệnh xơ gan, theo một phương án, hợp chất có thể được dùng kết hợp hoặc xen kẽ với thuốc khác mà thường được sử dụng để điều trị bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), ví dụ, như được mô tả bởi Andrew Zhu trong “New Agents on the Horizon in Hepatocellular Carcinoma” Therapeutic Advances in Medical Oncology, V 5(1), January 2013, 41-50. Các ví dụ về các hợp chất thích hợp cho liệu pháp kết hợp khi vật chủ bị hoặc có nguy cơ bị HCC bao gồm chất chống tạo mạch, sunitinib, brivanib, linifanib, ramucirumab, bevacizumab, cediranib, pazopanib, TSU-68,

lenvatinib, kháng thể kháng EGFR, chất ức chế mTor, chất ức chế MEK, và chất ức chế histon deacetylaza.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp chung

Các phổ ^1H , ^{19}F và ^{31}P NMR được đo bằng quang phổ kế Brücker sử dụng phép biến đổi Fourier ở 400 MHz. Các phổ được thu trong DMSO- d_6 trừ khi có quy định khác. Độ bội spin được chỉ ra bằng các ký hiệu s (vạch đơn), d (vạch đôi), t (vạch ba), m (vạch bội) và, br (rộng). Hằng số ghép (J) được thông báo bằng Hz. Các phản ứng thường được thực hiện trong môi trường nitơ khô bằng cách sử dụng dung môi khan Sigma-Aldrich. Tất cả các hóa chất chung đều được mua từ các nguồn thương mại.

Các chữ viết tắt sau được sử dụng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế:

AUC: Vùng dưới đường cong

C_{24} : Nồng độ của thuốc trong huyết tương ở 24 giờ

$C_{24,ss}$: Nồng độ ở 24 giờ sau định liều ở trạng thái ổn định

C_{max} : Nồng độ cực đại của thuốc đạt được trong huyết tương

DCM: Diclometan

EtOAc: Etyl axetat

EtOH: Etanol

HPLC: Sắc ký lỏng cao áp

NaOH: Natri hydroxit

Na_2SO_4 : Natri sulphat (khan)

MeCN: Axetonitril

MeNH_2 : Metylamin

MeOH: Metanol

Na_2SO_4 : Natri sulfat

NaHCO_3 : Natri bicacbonat

NH_4Cl : Amoni clorua

NH₄OH: Amoni hydroxit

PE: Ete dầu hỏa

Ph₃P: Triphenylphosphin

RH: độ ẩm tương đối

Silicagel (cỡ lỗ từ 230 đến 400, Sorbent)

t-BuMgCl: *t*-Butyl magie clorua

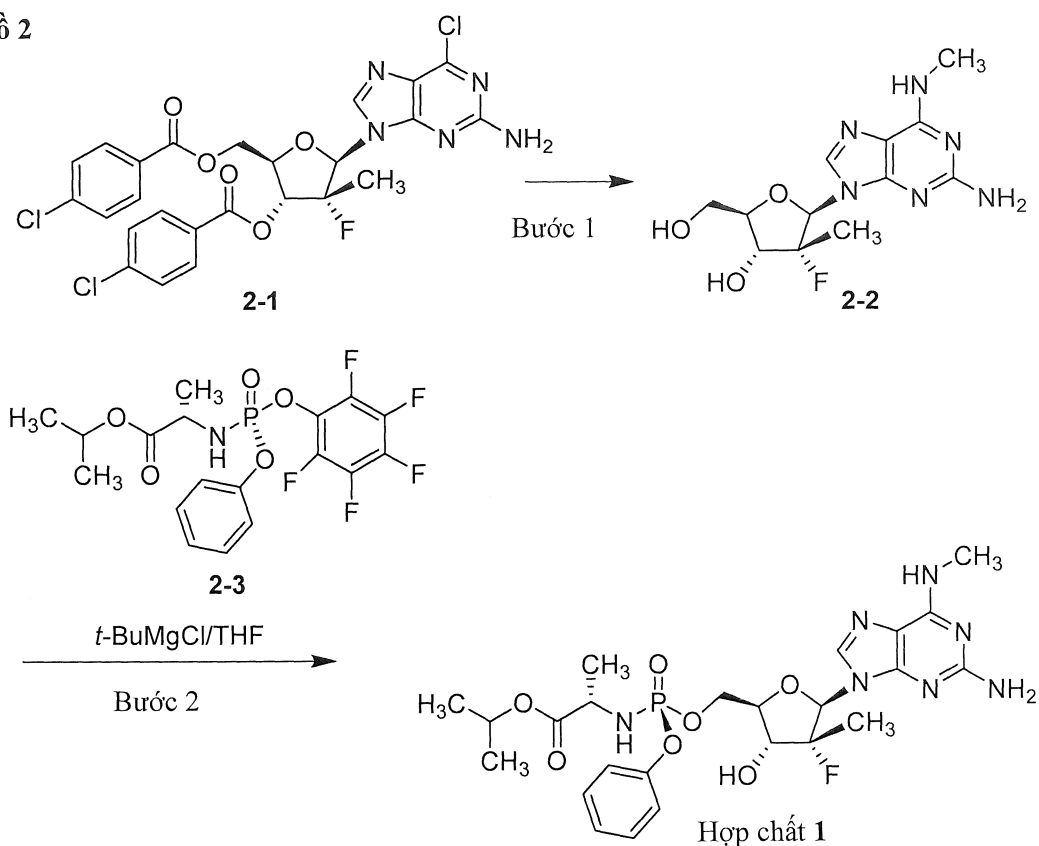
T_{max}: Thời gian tại đó C_{max} đạt được

THF: Tetrahydrofuran (THF), khan

TP: Triphosphat

Ví dụ 1. Tổng hợp hợp chất 1

Sơ đồ 2



Bước 1: Tổng hợp (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-Amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-4-methyltetrahydrofuran-3-ol (**2-2**)

Bình nón 50 L được nạp metanol (30 L) và được khuấy ở 10 ± 5 °C. NH₂CH₃ (3,95 Kg) được thông khí từ từ vào bình phản ứng ở 10 ± 5 °C. Hợp chất **2-1** (3,77 kg) được bổ sung theo các mẻ ở 20 ± 5 °C và được khuấy trong 1 giờ thu được dung dịch

trong. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 – 8 giờ nữa, tại thời điểm này HPLC chỉ ra rằng chất trung gian là nhỏ hơn 0,1% dung dịch. Bình phản ứng được nạp chất rắn NaOH (254 g), được khuấy trong 30 phút và được cô ở 50 ± 5 °C (độ chân không: -0,095). Phần cặn tạo thành được nạp EtOH (40 L) và được tạo huyền phù lại trong 1 giờ ở 60 °C. Tiếp theo, hỗn hợp được lọc qua celite và bánh lọc được tạo huyền phù lại bằng EtOH (15 L) trong 1 giờ ở 60 °C. Phần lọc được lọc nhiều hơn một lần, được kết hợp với phần lọc từ bước lọc trước đó, và tiếp theo được cô ở 50 ± 5 °C (độ chân không: -0,095). Lượng lớn chất rắn được kết tủa. EtOAc (6 L) được bổ sung vào phần cặn rắn và hỗn hợp được cô ở 50 ± 5 °C (độ chân không: -0,095). DCM tiếp theo được bổ sung vào phần cặn và hỗn hợp được tạo huyền phù lại hồi lưu trong 1 giờ, được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được lọc, và được sấy khô ở 50 ± 5 °C trong lò chân không thu được hợp chất 2-2 dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (1,89 Kg, 95,3%, độ tinh khiết 99,2%).

Phương pháp phân tích đối với Hợp chất 2-2: Độ tinh khiết của Hợp chất 2-2 (15 mg) được thu bằng cách sử dụng hệ thống HPLC Agilent 1100 có lắp cột Agilent Poroshell 120 EC-C18 4,6*150mm 4-Micron với các điều kiện sau: lưu lượng 1 mL/phút, đọc ở 254 nm, nhiệt độ cột 30 °C, thể tích tiêm 15 µL, và thời gian chạy 31 phút. Mẫu được hòa tan trong axetonitril – nước (20:80) (v/v). Phương pháp gradien được thể hiện dưới đây.

Thời gian (phút)	A% (0,05 TFA trong nước)	B% (Axetonitril)
0	95	5
8	80	20
13	50	50
23	5	95
26	5	95
26,1	95	5
31	95	5

Bước 2: Tổng hợp isopropyl((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-Amino-6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat (Hợp chất 1)

Hợp chất **2-2** và hợp chất **2-3** (isopropyl ((perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninat) được hòa tan trong THF (1 L) và được khuấy trong môi trường khí nitơ. Tiếp theo, huyền phù thu được được làm lạnh đến nhiệt độ thấp hơn $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ và dung dịch *t*-BuMgCl 1,7 M (384 mL) được bổ sung từ từ trong 1,5 giờ trong khi nhiệt độ $5\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ được duy trì. Dung dịch chứa NH_4Cl (2 L) và nước (8 L) được bổ sung vào huyền phù ở nhiệt độ trong phòng tiếp theo là DCM. Hỗn hợp được khuấy trong 5 phút trước khi dung dịch nước K_2CO_3 5% (10 L) được bổ sung và hỗn hợp thu được được khuấy trong 5 phút nữa trước khi lọc qua diatomit (500 g). Diatomit được rửa bằng DCM và phần lọc được tách ra. Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước K_2CO_3 5% (10 L x 2), nước muối (10 L x 3), và được sấy khô trên Na_2SO_4 (500 g) trong khoảng 1 giờ. Trong khi đó, toàn bộ quy trình này được lặp lại 7 lần đồng thời và 8 mẻ được kết hợp. Các pha hữu cơ được lọc và được cô ở $45 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (độ chân không 0,09 Mpa). EtOAc được bổ sung và hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ ở $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ và tiếp theo ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Tiếp theo, hỗn hợp được lọc và được rửa bằng EtOAc (2 L) thu được Hợp chất thô **1**. Chất thô được hòa tan trong DCM (12 L), heptan (18 L) được bổ sung ở $10\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$, và hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ này. Hỗn hợp được lọc, được rửa bằng heptan (5 L), và được sấy khô ở $50 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ thu được Hợp chất tinh khiết **1** (1650 g, 60%).

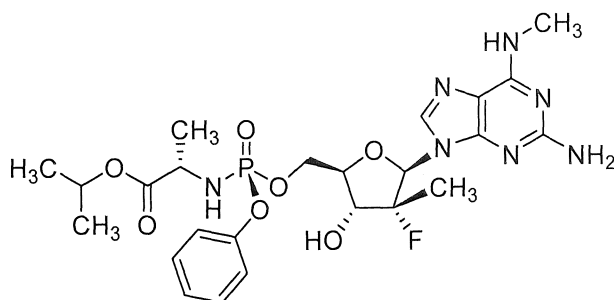
Phương pháp phân tích đối với Hợp chất **1**: Độ tinh khiết của Hợp chất **1** (25 mg) được thu bằng cách sử dụng hệ thống HPLC Agilent 110 có lắp cột Waters XTerra Phenyl $5\mu\text{m}$ $4,6 \times 250\text{ mm}$ với các điều kiện sau: lưu lượng 1 mL/phút, đọc ở 254 nm, nhiệt độ cột $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, thể tích tiêm $15\text{ }\mu\text{L}$, và thời gian chạy 25 phút. Mẫu được hòa tan trong axetonitril – nước (50:50) (v/v). Phương pháp gradien được thể hiện dưới đây.

Thời gian (phút)	A% (0,1% H_3PO_4 trong nước)	B% (Axetonitril)
0	90	10
20	20	80
20,1	90	10
25	90	10

Ví dụ 2. Xác định Hợp chất **1** vô định hình và dạng tinh thể

Hợp chất **1** vô định hình và Hợp chất **1** dạng tinh thể trước hết được phân tích bằng XRPD, ^1H NMR, và HPLC. Các mẫu XRPD đối với cả hai hợp chất được thể hiện trên FIG. 1A và các vết HPLC để xác định độ tinh khiết lần lượt được thể hiện trên FIG. 1B và 2A. Bảng 1 là danh mục các đỉnh từ XRPD của Hợp chất **1** dạng tinh thể và bảng 2 là danh mục thời gian lưu giữ tương đối (RTT) từ các vết HPLC. Hợp chất **1** vô định hình có độ tinh khiết 98,61% và Hợp chất **1** dạng tinh thể có độ tinh khiết 99,11%. Cả hai hợp chất đều là chất rắn màu trắng. FIG. 2B là các đồ thị TGA và DSC của Hợp chất **1** dạng tinh thể. Đối với Hợp chất **1** dạng tinh thể, đường thu nhiệt được quan sát thấy ở 88,6 °C và mất 7,8% khối lượng từ 80 – 110 °C.

Một mẫu của Hợp chất **1** được kết tinh lại từ EtOAc/hexan và được vẽ bằng ORTEP. Cấu trúc tuyệt đối của Hợp chất **1** được xác nhận bằng quá trình kết tinh của tinh thể đơn. FIG. 3 là hình vẽ ORTEP của Hợp chất **1**. Dữ liệu tinh thể và dữ liệu đo được thể hiện trong Bảng 3. Hóa lập thể tuyệt đối của Hợp chất **1** dựa trên tinh thể học tia X được thể hiện dưới đây:



Dữ liệu DSC được thu thập bằng TA Instruments Q2000 có lắp bộ lấy mẫu tự động 50 vị trí. Việc hiệu chỉnh nhiệt dung được thực hiện bằng cách sử dụng saphia và việc hiệu chỉnh năng lượng và nhiệt độ được thực hiện bằng cách sử dụng indi đã được chứng nhận. Thông thường, khoảng 3 mg mỗi mẫu, trong chảo nhôm đục lỗ nhỏ, được gia nhiệt ở 10 °C/phút từ 25 °C đến 200 °C. Sục nitơ khô ở 50 ml/phút được duy trì trên mẫu. Phần mềm giám sát thiết bị là Advantage for Q Series v2.8.0.394 và Thermal Advantage v5.5.3 và dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Universal Analysis v4.5A.

Dữ liệu TGA được thu thập bằng TA Instruments Q500 TGA, có lắp bộ lấy mẫu tự động 16 vị trí. Thiết bị được hiệu chỉnh nhiệt độ bằng cách sử dụng hợp kim alumen và niken. Thông thường, 5 – 10 mg mỗi mẫu được nạp lên chảo DCS bằng nhôm đã cân bì và được gia nhiệt ở 10 °C/phút từ nhiệt độ môi trường đến 350 °C. Sục nitơ ở 60

ml/phút được duy trì trên mẫu. Phần mềm giám sát thiết bị là Advantage for Q Series v2.5.0.256 và Thermal Advantage v5.5.3 và dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Universal Analysis v4.5.

Hợp chất **1** vô định hình (**1-1**):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,01 - 1,15 (m, 9 H), 1,21 (d, $J=7,20$ Hz, 3 H), 2,75 - 3,08 (m, 3 H), 3,71 - 3,87 (m, 1 H), 4,02 - 4,13 (m, 1 H), 4,22 - 4,53 (m, 3 H), 4,81 (s, 1 H), 5,69 - 5,86 (m, 1 H), 6,04 (br d, $J=19,33$ Hz, 4 H), 7,12 - 7,27 (m, 3 H), 7,27 - 7,44 (m, 3 H), 7,81 (s, 1 H)

Hợp chất **1** dạng tinh thể (**1-2**):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,97 - 1,16 (m, 16 H), 1,21 (d, $J=7,07$ Hz, 3 H), 2,87 (br s, 3 H), 3,08 (s, 2 H), 3,79 (br d, $J=7,07$ Hz, 1 H), 4,08 (br d, $J=7,58$ Hz, 1 H), 4,17 - 4,55 (m, 3 H), 4,81 (quin, $J=6,25$ Hz, 1 H), 5,78 (br s, 1 H), 5,91 - 6,15 (m, 4 H), 7,10 - 7,26 (m, 3 H), 7,26 - 7,44 (m, 3 H), 7,81 (s, 1 H)

Bảng 1. Danh mục đỉnh đối với Hợp chất 1 dạng tinh thể

Góc / °2 θ	Khoảng cách d/ Å	Cường độ / Số đếm	Cường độ / %
6,03	14,64	1005	39,0
7,36	12,00	315	12,2
7,94	11,13	1724	66,9
9,34	9,47	2500	97,0
9,51	9,29	860	33,4
9,77	9,05	1591	61,8
11,08	7,98	2576	100,0
12,02	7,36	171	6,6
12,95	6,83	319	12,4
13,98	6,33	241	9,4
14,30	6,19	550	21,4
14,69	6,03	328	12,7
15,20	5,82	2176	84,5
15,94	5,56	1446	56,1

16,75	5,29	1009	39,2
17,29	5,13	700	27,2
17,72	5,00	1213	47,1
18,11	4,89	1565	60,8
18,46	4,80	302	11,7
18,89	4,69	385	14,9
19,63	4,52	636	24,7
20,37	4,36	1214	47,1
20,74	4,28	1198	46,5
21,24	4,18	640	24,8
22,31	3,98	961	37,3
22,88	3,88	806	31,3
23,43	3,79	355	13,8
24,08	3,69	573	22,2
24,49	3,63	159	6,2
25,00	3,56	351	13,6
25,36	3,51	293	11,4
26,09	3,41	235	9,1
26,26	3,39	301	11,7
26,83	3,32	696	27,0
27,35	3,26	436	16,9
27,46	3,25	363	14,1
28,07	3,18	200	7,8
28,30	3,15	195	7,6
28,82	3,10	599	23,3
29,85	2,99	217	8,4
30,26	2,95	186	7,2
30,75	2,91	333	12,9
31,12	2,87	149	5,8
31,85	2,81	238	9,2
33,28	2,69	261	10,1

34,77	2,58	171	6,6
35,18	2,55	175	6,8
36,83	2,44	327	12,7
37,41	2,40	172	6,7

Bảng 2. Thời gian lưu giữ tương đối từ ảnh sắc ký HPLC của Hợp chất 1 vô định hình và Hợp chất 1 dạng tinh thể

Hợp chất 1 vô định hình		Hợp chất 1 dạng tinh thể	
RRT	Diện tích %	RRT	Diện tích %
0,48	0,15	0,48	0,17
0,51	0,04	0,48	0,17
0,48	0,15	0,94	0,12
0,51	0,04	1,00	99,11
0,94	0,13	1,04	0,22
0,98	0,21	1,37	0,07
1,00	98,61		
1,04	0,29		
1,37	0,31		

Bảng 3. Số đo tinh thể và số liệu của Hợp chất 1

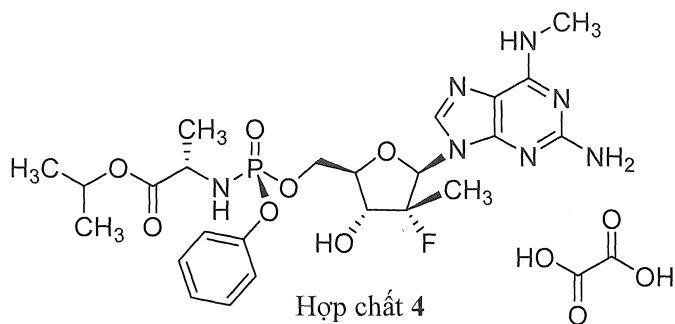
Độ chính xác liên kết	C-C = 0,0297Å, Bước sóng = 1,54184	
Ô	a=10,1884(3) b=28,6482(9) c=12,9497(5) alpha=90 beta=113,184(4) gamma=90	
Nhiệt độ	150K	
	Tính toán	Thông báo
Thể tích	3474,5(2)	3474,5(2)
Nhóm không gian	P21	P 1 21 1
Nhóm Hall	P 2yb	P 2yb
Công thức gốc	C ₂₄ H ₃₄ F N ₇ O ₇ P	2(C ₂₄ H ₃₄ F N ₇ O ₇ P)
Công thức tổng	C ₂₄ H ₃₄ F N ₇ O ₇ P	C ₄₈ H ₆₈ F ₂ N ₁₄ O ₁₄ P ₂
Mr	582,55	1165,10

Dx, g cm ⁻¹	1,114	1,114
Z	4	2
Mu (mm ⁻¹)	1,139	1,139
F000	1228,0	1228,0
F000'	1233,21	
h, k, l _{max}	12,34,15	12,34,15
N _{ref}	12742 [6510]	8259
T _{min} , T _{max}	0,790, 0,815	0,808, 1,000
T _{min} '	0,716	
Phương pháp hiệu chỉnh	Giới hạn T được thông báo: T _{min} = 0,808 T _{max} = 1,00	
AbsCorr	MULTI-SCAN	
Tính đầy đủ của dữ liệu	1,27/0,65	
Theta (cực đại)	68,244	
R (phản xạ)	0,2091 (7995)	
wR2 (phản xạ)	0,5338 (8259)	
S	2,875	
Npar	716	

Xác định ban đầu này được kèm theo bảo quản ở 25 °C / 60% độ ẩm tương đối (RH) trong 14 ngày có phân tích bằng HPLC và XRPD sau 7 và 14 ngày. FIG. 4A là XRPD sau 14 ngày ở 25 °C / 60% (RH). Hợp chất **1** vô định hình (mẫu 1-1) vẫn kết tinh kém, trong khi Hợp chất **1** dạng tinh thể (mẫu 1-2) vẫn giữ khả năng kết tinh của nó, nhưng cả hai hợp chất đều ổn định sau 14 ngày ở 25 °C / 60% (RH).

Ví dụ 3. Sự tạo Hợp chất muối oxalat **4**

Trước hết, muối oxalat của Hợp chất **1**, Hợp chất **4**, được tạo ra bằng cách trộn muối oxalic với dung môi (5 vol, 100 µL) và cho phép dung dịch bất kỳ bay hơi ở nhiệt độ trong phòng. Huyền phù bất kỳ được làm chín muối (nhiệt độ trong phòng – 50 °C) trong 3 giờ và độ kết tinh được tiếp cận.



Bảng 4 thể hiện các dung môi khác nhau được sử dụng trong sản xuất Hợp chất 4. Tất cả các dung môi ngoại trừ hai dung môi (xyclohexan và *n*-heptan) đều tạo ra các sản phẩm kết tinh. Mặc dù Hợp chất 4 có độ kết tinh và độ tan cao, các muối oxalat đều không thể chấp nhận cho việc phát triển lâm sàng do khả năng tạo sỏi thận và các muối khác của Hợp chất 1 được nghiên cứu.

Bảng 4. Sự tạo Hợp chất oxalat 4

Dung môi	Quan sát sau khi bổ sung axit ở nhiệt độ trong phòng	Quan sát sau chín muối/bay hơi
EtOH	Dung dịch	OXA – Dạng 1
IPA	Dung dịch	OXA – Dạng 1
Axeton	Dung dịch	OXA – Dạng 1
MEK	Dung dịch	OXA – Dạng 1
EtOAc	Huyền phù	OXA – Dạng 1
<i>i</i> PrOAc	Huyền phù	OXA – Dạng 1
THF	Dung dịch	OXA – Dạng 1
Toluen	Dung dịch	OXA – Dạng 1
MeCN	Dung dịch	OXA – Dạng 1
IPA:10% nước	Dung dịch	OXA – Dạng 1
TBME	Huyền phù	OXA – Dạng 1
Xyclohexan	Huyền phù	Vô định hình
<i>n</i> -Heptan	Huyền phù	Vô định hình

Ví dụ 4. Các hợp chất muối của Hợp chất 1 vô định hình

Do hợp chất muối oxalat **4** (Ví dụ 3) không thể được thực hiện tiếp trong các thử nghiệm lâm sàng do nó có khả năng tạo ra sỏi thận, các muối vô định hình của Hợp chất **1** để tạo ra bằng các ion trái dấu nêu trong bảng 5. Hợp chất **1** được hòa tan trong *t*-butanol (20 vol, 6 ml) và dung dịch được xử lý bằng ion trái dấu axit (1 đương lượng cho mỗi mẫu ngoại trừ mẫu 1-9 có 0,5 đương lượng sulfat). Tiếp theo, các mẫu được làm lạnh với dung môi được loại bỏ bằng cách đông khô. Chất rắn còn lại trong các mẫu 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, và 1-9 trước hết được phân tích bằng XRPD và HPLC.

Bảng 5. Chi tiết sự tạo muối vô định hình

Ký hiệu mẫu	Chi tiết mẫu	Chi tiết dung dịch gốc	Quan sát	NMR
1-4	HCl (1:1)	THF 1M	Chất rắn màu trắng	ít hơn 3 proton ~0,3 eq <i>t</i> -BuOH
1-5	Sulfuric (1:1)	THF 1M	Chất rắn màu trắng	ít hơn 3 proton ~0,3 eq <i>t</i> -BuOH
1-6	Fumaric (1:1)	MeOH:THF (1:1) 0,5M	Chất rắn dạng thủy tinh	1,05 eq axit fumaric 0,84 eq <i>t</i> -BuOH
1-7	Benzoic (1:1)	THF 1M	Chất rắn màu trắng	1,0 eq axit benzoic 0,34 eq <i>t</i> -BuOH
1-8	Suxinic (1:1)	MeOH 1M	Chất rắn dính màu trắng	~ 1,1 eq axit suxinic 0,37 eq <i>t</i> -BuOH
1-9	Sulfuric (0,5:1 axit:API)	THF 1M	Chất rắn màu trắng	ít hơn 3 proton ~0,3 eq <i>t</i> -BuOH

Phổ ^1H NMR được đo đối với tất cả các mẫu.

Mẫu 1-4, muối HCl (1:1):

^1H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0,93 - 1,39 (m, 16 H), 2,97 (br s, 2 H), 3,70 - 3,88 (m, 1 H), 4,10 (br s, 1 H), 4,18 - 4,49 (m, 3 H), 4,70 - 4,88 (m, 1 H), 5,71 -

5,94 (m, 1 H), 6,07 (br d, $J=19,07$ Hz, 2 H), 7,14 - 7,27 (m, 3 H), 7,29 - 7,44 (m, 2 H), 7,83 - 8,19 (m, 1 H)

Mẫu 1-5, muối sulfuric (1:1):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,97 - 1,38 (m, 15 H), 2,96 (br s, 2 H), 4,06 - 4,18 (m, 1 H), 4,19 - 4,49 (m, 3 H), 4,66 - 4,91 (m, 1 H), 5,70 - 5,95 (m, 1 H), 5,96 - 6,16 (m, 2 H), 7,10 - 7,27 (m, 3 H), 7,30 - 7,43 (m, 2 H), 7,88 - 8,19 (m, 1 H)

Mẫu 1-6, muối fumaric (1:1):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,95 - 1,31 (m, 21 H), 2,87 (br s, 3 H), 3,79 (br d, $J=7,20$ Hz, 1 H), 4,01 - 4,13 (m, 1 H), 4,16 - 4,23 (m, 1 H), 4,16 - 4,24 (m, 1 H), 4,20 (s, 1 H), 4,18 - 4,23 (m, 1 H), 4,24 - 4,52 (m, 1 H), 4,24 - 4,52 (m, 1 H), 4,24 - 4,49 (m, 1 H), 4,72 - 4,88 (m, 1 H), 5,68 - 5,86 (m, 1 H), 6,04 (br d, $J=19,33$ Hz, 4 H), 6,63 (s, 1 H), 6,61 - 6,66 (m, 1 H), 7,12 - 7,27 (m, 3 H), 7,27 - 7,45 (m, 3 H), 7,81 (s, 1 H), 13,16 (br s, 2 H)

Mẫu 1-7, muối benzoic (1:1):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,96 - 1,30 (m, 15 H), 2,87 (br s, 3 H), 3,79 (br d, $J=7,07$ Hz, 1 H), 4,07 (br s, 1 H), 4,20 (s, 1 H), 4,25 - 4,52 (m, 3 H), 4,81 (s, 1 H), 5,71 - 5,85 (m, 1 H), 6,04 (br d, $J=19,33$ Hz, 4 H), 7,08 - 7,27 (m, 3 H), 7,27 - 7,43 (m, 3 H), 7,45 - 7,57 (m, 2 H), 7,63 (s, 1 H), 7,81 (s, 1 H), 7,95 (dd, $J=8,27, 1,33$ Hz, 2 H), 12,98 (br s, 1 H)

Mẫu 1-8, muối succinic (1:1):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,98 - 1,28 (m, 15 H), 2,42 (s, 5 H), 2,87 (br s, 3 H), 3,57 - 3,62 (m, 1 H), 3,70 - 3,86 (m, 1 H), 4,02 - 4,14 (m, 1 H), 4,20 (s, 1 H), 4,24 - 4,51 (m, 3 H), 4,70 - 4,88 (m, 1 H), 5,69 - 5,86 (m, 1 H), 6,04 (br d, $J=19,33$ Hz, 4 H), 7,12 - 7,27 (m, 3 H), 7,27 - 7,44 (m, 3 H), 7,81 (s, 1 H), 11,95 - 12,58 (m, 2 H)

Mẫu 1-9, muối sulfuric (0,5:1):

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,02 - 1,31 (m, 15 H), 2,94 (br s, 3 H), 3,79 (br d, $J=7,20$ Hz, 2 H), 4,09 (br s, 1 H), 4,22 - 4,48 (m, 3 H), 4,72 - 4,90 (m, 1 H), 5,71 - 5,92 (m, 1 H), 6,07 (br d, $J=19,07$ Hz, 2 H), 7,12 - 7,28 (m, 3 H), 7,31 - 7,44 (m, 2 H), 7,75 - 8,19 (m, 1 H).

Tiếp theo, các mẫu được bảo quản ở 25 °C / 60% độ ẩm tương đối (RH) trong 14 ngày có phân tích bằng HPLC và XRPD sau 7 (FIG. 4B) và 14 ngày (FIG. 5A). Tất cả các muối điều chế được vẫn là vô định hình và các quan sát được thể hiện trong Bảng 6. Các muối mono sulfat (mẫu 1-5) và suxinat (mẫu 1-8) được phát hiện là không ổn định vật lý và chảy rữa hoặc trở thành gồm trong quá trình nghiên cứu. Cả hai muối fumarat (mẫu 1-6) và benzoat (mẫu 1-7) được phát hiện là chất rắn dạng thủy tinh. Muối HCl (mẫu 1-4) được phát hiện là vẫn giữ được hình dạng vật lý của nó. Ngạc nhiên là, muối hemi-sulfat (mẫu 1-9) cũng giữ được hình dạng vật lý của nó dưới dạng chất rắn màu trắng ngược với hợp chất mono-sulfat (mẫu 1-5), hợp chất này là gồm dính. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6. Muối mono HCl (mẫu 1-4) và muối hemi-sulfat (mẫu 1-9) được phát hiện là ổn định vật lý và hóa học sau 2 tuần bảo quản ở 25 °C / 60% độ ẩm tương đối (RH). Mặc dù cả hai muối đều ổn định trong hai tuần, muối hemi-sulfat là tốt hơn so với muối HCl do muối HCl có tính hút ẩm, khiến cho nó kém hữu dụng so với muối hemi-sulfat khi sử dụng hoặc bảo quản trong thời gian dài.

Bảng 6. Độ ổn định của các mẫu sau 7 và 14 ngày ở 25 °C / 60% RH

Ký hiệu mẫu	Thời gian tiếp xúc với 25 °C / 60% RH (ngày)					
	0		7		14	
	HPLC	Quan sát	HPLC	Quan sát	HPLC	Quan sát
1-1	98,6	Chất rắn màu trắng	98,7	Chất rắn màu trắng	98,5	Chất rắn màu trắng
1-2	99,1	Chất rắn màu trắng	99,2	Chất rắn màu trắng	99,0	Chất rắn màu trắng
1-3	99,7	Chất rắn màu trắng	99,6	Chất rắn màu trắng	99,4	Chất rắn màu trắng
1-4	98,7	Chất rắn màu trắng	98,8	Chất rắn màu trắng	98,6	Chất rắn màu trắng
1-5	98,4	Chất rắn màu trắng	55,7	Chất rắn dính màu trắng	-	Gôm dính

1-6	98,7	Chất rắn dạng thủy tinh	98,6	Chất rắn dạng thủy tinh trong	98,4	Chất rắn dạng thủy tinh màu trắng
1-7	98,8	Chất rắn màu trắng	98,8	Chất rắn dạng thủy tinh trong	98,7	Chất rắn dạng thủy tinh trong
1-8	98,7	Chất rắn dính màu trắng	-	Chảy rữa / dầu dính	-	Chảy rữa
1-9	98,7	Chất rắn màu trắng	98,1	Chất rắn màu trắng	96,4	Chất rắn màu trắng

Ví dụ 5. Xác định Hợp chất 2 vô định hình

Trước hết, hợp chất 2 vô định hình được phân tích bằng XRPD, ^1H NMR, DSC, TGA, và HPLC. Mẫu XRPD đối với hợp chất 2 vô định hình xếp chồng lên hợp chất 1 vô định hình và Hợp chất 1 dạng tinh thể được thể hiện trên FIG. 1A và mẫu XRPD của hợp chất 2 vô định hình riêng rẽ được thể hiện trên FIG. 5B. Bảng 7 là danh mục đỉnh từ mẫu XRPD được thể hiện trên FIG. 5B. Vạch HPLC để xác định độ tinh khiết là được thể hiện trên FIG. 6A. Bảng 8 là danh mục thời gian lưu giữ tương đối (RTT) từ vạch HPLC được thể hiện trên FIG. 6A. Hợp chất 2 vô định hình có độ tinh khiết 99,68%. FIG. 6B là đồ thị TGA và DSC của hợp chất 2 vô định hình. Chi tiết thực nghiệm đối với các thử nghiệm TGA và DSC được thể hiện trong Ví dụ 2.

Bảng 7. Danh mục đỉnh đối với Hợp chất 2 vô định hình

Góc / $^{\circ}2\theta$	Khoảng cách d / Å	Cường độ / Số đếm	Cường độ / %
4,20	21,03	486	81,8
4,67	18,91	482	81,0
5,16	17,10	595	100,0
9,13	9,68	547	92,0

Bảng 8. Ảnh sắc ký HPLC của Hợp chất 2 vô định hình

Hợp chất 2 vô định hình	
RRT	Diện tích %
0,48	0,02
0,48	0,02
0,67	0,01
0,94	0,13
1,00	99,68
1,04	0,06

Hợp chất 2 vô định hình:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,93 - 1,29 (m, 13 H), 2,94 (br s, 3 H), 3,79 (td, $J=10,04$, 7,07 Hz, 2 H), 4,05 - 4,19 (m, 1 H), 4,19 - 4,50 (m, 3 H), 4,81 (quin, $J=6,25$ Hz, 1 H), 5,71 - 5,94 (m, 1 H), 5,97 - 6,16 (m, 2 H), 7,14 - 7,28 (m, 3 H), 7,31 - 7,44 (m, 2 H), 7,82 - 8,09 (m, 1 H)

Ví dụ 6. Kết tinh Hợp chất 2 vô định hình

Do muối hemi-sulfat được phát hiện là vẫn ở dạng chất rắn sau 14 ngày nghiên cứu độ ổn định như được thể hiện trong Bảng 6, các thử nghiệm sơ bộ nghiên cứu điều kiện kết tinh bằng cách sử dụng 11 dung môi khác nhau được thực hiện. Hợp chất 2 vô định hình được tạo huyền phù trong 5 thể tích dung môi ở 25 °C (mẫu 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, và 2-11). Đối với các mẫu không chảy tự do (2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, và 2-10), 5 thể tích dung môi nữa được bổ sung. Tiếp theo, các mẫu được làm chín muối ở 25 – 50 °C (1 °C/phút giữa các nhiệt độ và 4 giờ ở mỗi nhiệt độ) trong 6 ngày ngoại trừ mẫu 2-1, mẫu này được quan sát là dung dịch trong sau 1 ngày và được cho bay hơi trong điều kiện môi trường. Kết quả được thể hiện trong Bảng 9. Các mẫu tinh thể thu được từ việc kết tinh bằng isobutanol (mẫu 2-1), axeton (mẫu 2-2), EtOAc (mẫu 2-6), và *i*PrOAc (mẫu 2-7). Hai mẫu kết tinh kém cũng được nhận dạng từ việc kết tinh bằng MEK (mẫu 2-4) và MIBK (mẫu 2-5). Các mẫu XRPD được thể hiện trên FIG. 7A.

Bảng 9. Điều kiện kết tinh của Hợp chất 2

Ký hiệu mẫu	Dung môi	Quan sát sau 5 thể tích	Quan sát sau 10 thể tích	Quan sát sau 1 ngày chín muối	XRPD
2-1	IPA	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Dung dịch, được bay hơi ở RT thu được gồm	Gôm
2-2	Isobutanol	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh - Mẫu 2
2-3	Axeton	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh - Mẫu 3
2-4	MEK	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh kém – Mẫu 4
2-5	MIBK	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh kém – Mẫu 4
2-6	EtOAc	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh - Mẫu 1
2-7	iPrOAc	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh - Mẫu 1
2-8	THF	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Kết tinh kém

2-9	TBME	Huyền phù chảy tự do	-	Huyền phù	Vô định hình
2-10	Toluen	Chất rắn – không chảy tự do	Huyền phù chảy tự do	Huyền phù	Vô định hình
2-11	Heptan	Huyền phù chảy tự do	-	Huyền phù	Vô định hình

Bảy mẫu (các mẫu 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 và 2-8) được phân tích bằng DSC, TGA, $^1\text{H-NMR}$ và IC (Bảng 10, FIG. 8A, FIG. 8B, FIG. 9A, FIG. 9B, FIG. 10A, FIG. 10B, FIG. 11A, và FIG. 11B) cũng như bằng XRPD sau 6 ngày bảo quản ở 25 °C / 60% độ ẩm tương đối (RH) (tất cả các mẫu vẫn kết tinh / kết tinh kém sau khi ổn định). Tất cả các mẫu giữ lại khoảng một nửa đương lượng sulfat, nhưng chứa lượng tương đối lớn dung môi dư. Chồng lớp ảnh nhiễu xạ tia X của các mẫu vô định hình 2-9, 2-10, và 2-11 được thể hiện trên FIG. 7B.

Bảng 10. Xác định các mẫu Hợp chất 2 dạng tinh thể

Ký hiệu mẫu	Dung môi	DSC	TGA	^1HNM R	IC (hiệu chỉnh đối với TGA)
2-2	Isobutanol	Đỉnh thu nhiệt 113,8 °C	8,3% môi trường- 140 °C	1,1 eq isobutanol	0,45 eq
2-3	Axeton	Đỉnh thu nhiệt 30-95 °C Đỉnh thu nhiệt 100- 145 °C	7,6% môi trường - 140 °C	0,5 eq axeton	0,46 eq
2-4	MEK	Đỉnh thu nhiệt phức rộng 30- 115 °C	8,5 % môi trường - 140 °C	0,8 eq MEK	0,45 eq

		Đỉnh thu nhiệt 115-145 °C			
2-5	MIBK	Đỉnh thu nhiệt rộng 30-105 °C Đỉnh thu nhiệt 114,7 °C	5,2% môi trường - 110 °C	0,2 eq MIBK	0,46 eq
2-6	EtOAc	Đỉnh thu nhiệt nhọn 113,6 °C	2,0% môi trường- 100 °C	0,9 eq EtOAc	0,46 eq
2-7	iPrOAc	Đỉnh thu nhiệt 30-90 °C	1,6% môi trường- 90 °C	0,8 eq iPrOAc	0,45 eq
2-8	THF	Đỉnh thu nhiệt 30-100 °C Đỉnh thu nhiệt nhọn 115,6 °C	4,2% môi trường- 130 °C	0,7 eq THF	0,45 eq

Phổ ^1H NMR được đo đối với tất cả các mẫu và được nêu dưới đây.

Mẫu 2-2:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,83 (d, $J=6,69$ Hz, 7 H), 0,99 - 1,26 (m, 14 H), 1,61 (dt, $J=13,26, 6,63$ Hz, 1 H), 3,73 - 3,87 (m, 2 H), 4,03 - 4,18 (m, 1 H), 4,18 - 4,51 (m, 4 H), 4,66 - 4,92 (m, 1 H), 4,70 - 4,90 (m, 1 H), 4,72 - 4,88 (m, 1 H), 5,81 (br s, 1 H), 5,93 - 6,11 (m, 2 H), 7,10 - 7,26 (m, 3 H), 7,14 - 7,26 (m, 1 H), 7,30 - 7,41 (m, 2 H), 7,94 (br s, 1 H)

Mẫu 2-3:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,00 - 1,26 (m, 13 H), 2,09 (s, 3 H), 3,74 - 3,87 (m, 2 H), 4,10 (br d, $J=7,70$ Hz, 1 H), 4,22 - 4,50 (m, 3 H), 4,81 (quin, $J=6,28$ Hz, 1 H), 5,71 - 5,90 (m, 1 H), 5,96 - 6,15 (m, 2 H), 7,12 - 7,26 (m, 3 H), 7,31 - 7,41 (m, 2 H), 7,79 - 8,07 (m, 1 H)

Mẫu 2-4:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,91 (t, $J=7,33$ Hz, 3 H), 1,01 - 1,28 (m, 13 H), 2,08 (s, 2 H), 3,72 - 3,89 (m, 2 H), 4,10 (br d, $J=8,08$ Hz, 1 H), 4,23 - 4,47 (m, 3 H), 4,81 (quin, $J=6,25$ Hz, 1 H), 5,69 - 5,89 (m, 1 H), 5,94 - 6,13 (m, 2 H), 7,14 - 7,25 (m, 3 H), 7,32 - 7,41 (m, 2 H), 7,79 - 8,11 (m, 1 H)

Mẫu 2-5:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,86 (d, $J=6,69$ Hz, 1 H), 0,98 - 1,33 (m, 13 H), 2,02 - 2,09 (m, 1 H), 4,03 - 4,17 (m, 1 H), 4,22 - 4,50 (m, 3 H), 4,81 (quin, $J=6,25$ Hz, 1 H), 5,81 (br s, 1 H), 5,93 - 6,15 (m, 2 H), 7,11 - 7,27 (m, 3 H), 7,31 - 7,41 (m, 2 H), 7,77 - 8,21 (m, 1 H)

Mẫu 2-6:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,98 - 1,28 (m, 15 H), 2,00 (s, 3 H), 3,99 - 4,14 (m, 3 H), 4,21 - 4,49 (m, 3 H), 4,81 (quin, $J=6,22$ Hz, 1 H), 5,82 (br s, 1 H), 5,93 - 6,14 (m, 2 H), 7,11 - 7,26 (m, 3 H), 7,29 - 7,42 (m, 2 H), 7,79 - 8,17 (m, 1 H)

Mẫu 2-7:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,92 - 1,28 (m, 17 H), 1,97 (s, 2 H), 4,04 - 4,16 (m, 1 H), 4,20 - 4,51 (m, 3 H), 4,71 - 4,93 (m, 2 H), 5,82 (br s, 1 H), 5,95 - 6,14 (m, 2 H), 7,11 - 7,28 (m, 3 H), 7,31 - 7,43 (m, 2 H), 7,75 - 8,21 (m, 1 H)

Mẫu 2-8:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,81 - 1,11 (m, 13 H), 1,19 (s, 1 H), 1,53 - 1,66 (m, 1 H), 3,87 - 4,01 (m, 1 H), 4,06 - 4,32 (m, 3 H), 4,64 (quin, $J=6,25$ Hz, 1 H), 5,55 - 5,75 (m, 1 H), 5,77 - 5,97 (m, 2 H), 6,94 - 7,10 (m, 3 H), 7,13 - 7,26 (m, 2 H), 7,66 - 7,96 (m, 1 H)

Ví dụ 7. Không thể kết tinh muối malonat vô định hình (Hợp chất 4)

Như được thể hiện trong Ví dụ 3, muối oxalat dạng tinh thể được nhận dạng khi xác định các muối thích hợp đối với Hợp chất 1, nhưng Hợp chất muối oxalat 4 không thể được sử dụng tiếp trong các thử nghiệm lâm sàng do nó có khả năng gây sỏi thận. Do đó, sự kết tinh của muối malonat liên quan về mặt hóa học (Hợp chất 5) được thử nghiệm bằng cách sử dụng 11 dung môi giống như đối với muối hemi-sulfat. Hợp chất 1 (12×50 mg, các mẫu 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, và 3-12) được hòa tan trong *t*-butanol (20 vol) và tiếp theo dung dịch được xử lý bằng 1 đương

lượng dung dịch gốc axit malonic (1 M trong THF). Tiếp theo, các mẫu được làm lạnh bằng dung môi được loại bỏ bằng cách làm khô lạnh chân không. Đối với các mẫu 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, và 3-11, dung môi thích hợp (5 thể tích) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch tạo thành bất kỳ được cho bay hơi trong điều kiện môi trường, trong khi gồm hoặc chất rắn được làm chín muối ở 25 – 50 °C (1 °C/phút giữa các nhiệt độ và 4 giờ ở mỗi nhiệt độ) trong 5 ngày. Chất rắn được phân tích bằng XRPD (FIG. 12B), nhưng tất cả các mẫu đều được phát hiện là tạo gồm hoặc là vô định hình (FIG. 12B). Kết quả được thể hiện trong Bảng 11. Một mẫu chất rắn (vô định hình) (3-12) được phân tích bằng ¹H-NMR và HPLC, và được phát hiện là chứa khoảng 1 đương lượng axit malonic (các đỉnh chồng lấp) cũng như 0,6 eq. *t*-BuOH. Hợp chất có độ tinh khiết 99,2% (FIG. 13A). FIG. 12A là XRDP của mẫu 3-12 và FIG. 13A là ảnh sắc ký HPLC của mẫu 3-12.

Mẫu 3-12:

¹H NMR (400 MHz, *DMSO-d*₆) δ ppm 0,81 - 1,11 (m, 13 H), 1,19 (s, 1 H), 1,53 - 1,66 (m, 1 H), 3,87 - 4,01 (m, 1 H), 4,06 - 4,32 (m, 3 H), 4,64 (quin, *J*=6,25 Hz, 1 H), 5,55 - 5,75 (m, 1 H), 5,77 - 5,97 (m, 2 H), 6,94 - 7,10 (m, 3 H), 7,13 - 7,26 (m, 2 H), 7,66 - 7,96 (m, 1 H)

Bảng 11. Điều kiện kết tinh của Hợp chất muối malonat vô định hình 4

Ký hiệu mẫu	Dung môi	Quan sát sau 5 thể tích	Quan sát sau 5 ngày chín muối / bay hơi	XRPD
3-1	IPA	Dung dịch trong*	Gôm trong	-
3-2	Isobutanol	Dung dịch trong*	Gôm trong	-
3-3	Axeton	Dung dịch trong*	Gôm trong	-
3-4	MEK	Dung dịch trong*	Gôm trong	-
3-5	MIBK	Dung dịch & một số gồm	Gôm trong	-

3-6	EtOAc	Dung dịch trong*	Gôm trong & vẻ tinh thể	Vô định hình
3-7	iPrOAc	Gôm	Gôm trong	-
3-8	THF	Dung dịch trong*	Gôm trong	-
3-9	TBME	Huyền phù đặc	Gôm trong	-
3-10	Toluen	Gôm trắng / chất rắn	Gôm trắng	Vô định hình
3-11	Heptan	Chất rắn màu trắng (ổn định)	Gôm trắng	Vô định hình
3-12	-	(Chất rắn màu trắng – không dung môi)	(Chất rắn dính màu trắng – điều kiện môi trường)	Vô định hình

*Được bay hơi ở nhiệt độ trong phòng

Ví dụ 8. Không thể tạo muối đầy đủ bằng cách sử dụng phương pháp nghiền có hỗ trợ bởi chất lỏng (LAG)

Nghiên cứu nghiền có hỗ trợ bởi chất lỏng (LAG) để xác định các muối thích hợp không phải hemi-sulfat được thực hiện bằng cách sử dụng 14 ion trái dấu axit trong bảng 12.

Bảng 12. Dung dịch gốc ion trái dấu được sử dụng trong kết tinh bằng LAG

Ion trái dấu	Dung môi (1 M)
Pamoic	DMSO
Malonic	THF
D-glucuronic	Nước
DL-mandelic	THF
D-gluconic	THF
Glycolic	THF
L-lactic	THF

Oleic	THF
L-ascorbic	Nước
Adipic	THF (nhiệt)
Caproic	THF
Stearic	THF
Palmitic	THF
Metansulfonic	THF

Hợp chất 1 (30 mg) được cho vào các lọ nhỏ HPLC có hai vòng bi 3 mm. Vật liệu được làm ướt bằng dung môi (15 μ l etanol, mẫu 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, và 4-14) và 1 đương lượng ion trái dấu axit được bổ sung. Tiếp theo, các mẫu là được nghiền trong 2 giờ ở 650 rpm bằng cách sử dụng hệ thống nghiền Fritsch có bộ nổi Automaxion. Hầu hết các mẫu sau nghiền được phát hiện là gồm trong và không được phân tích tiếp (Bảng 13). Các mẫu được quan sát thấy là chứa chất rắn được phân tích bằng XRPD và, trong tất cả các trường hợp, các mẫu thu được được phát hiện là khớp với các mẫu của ion trái dấu axit dạng tinh thể mà không có đỉnh bổ sung (FIG. 13B).

Bảng 13. Quan sát và kết quả XRPD từ LAG của Hợp chất 1

Ký hiệu mẫu	Axit	Quan sát sau nghiền	XRPD
4-1	Pamoic	Gôm màu vàng/chất rắn	Axit pamoic & halo vô định hình
4-2	Malonic	Gôm trong	-
4-3	D-glucuronic	Gôm/chất rắn màu trắng	Axit D-glucuronic & halo vô định hình
4-4	DL-mandelic	Gôm trong	-
4-5	D-gluconic	Gôm trong	-
4-6	Glycolic	Gôm trong	
4-7	L-Lactic	Gôm trong	-

4-8	Oleic	Gôm trong	-
4-9	L-ascorbic	Gôm/chất rắn màu trắng	Axit L-ascorbic & halo vô định hình
4-10	Adipic	Gôm trong	-
4-11	Caproic	Gôm trong	-
4-12	Stearic	Gôm/chất rắn màu trắng	Axit stearic & halo vô định hình
4-13	Palmitic	Gôm/chất rắn màu trắng	Axit palmitic & halo vô định hình
4-4	Metansulfonic	Gôm trong	-

Ví dụ 9. Không thể thu được sự tạo muối đầy đủ bằng cách sử dụng methyl ethyl keton (MEK)

Tiếp theo, methyl ethyl keton (MEK) được sử dụng làm dung môi để nghiên cứu các muối thích hợp không phải muối hemi-sulfat. Bằng cách sử dụng 14 ion trái dấu axit trong bảng 12, nghiên cứu được thực hiện bằng cách hòa tan Hợp chất 1 (50 mg) trong MEK (20 vol) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được xử lý bằng 1 đương lượng ion trái dấu đã chọn (Bảng 12). Tiếp theo, các mẫu được làm lạnh đến 5 °C ở 0,1 °C/phút và được khuấy ở nhiệt độ này qua đêm. Tất cả các mẫu được cho bay hơi trong điều kiện môi trường và chất rắn bất kỳ quan sát được được phân tích bằng XRPD. Quá trình bay hơi này chủ yếu tạo ra gôm, với ngoại trừ các mẫu có axit steric (mẫu 4-12) và axit palmitic (mẫu 5-13), tạo ra dung môi dạng thủy tinh. Các chất rắn này là vô định hình khi được xác định bằng XRPD, nhưng không có dạng tinh thể nào của muối được thu. Kết quả được thể hiện trong Bảng 14. (FIG. 13A).

Bảng 14. Kết quả từ hòa tan Hợp chất 1 trong MEK (20 thể tích)

Ký hiệu mẫu	Axit	Dung môi đối với axit ở 1 M	Quan sát khi bổ sung axit	Quan sát khi làm lạnh	Quan sát khi bay hơi
-------------	------	-----------------------------	---------------------------	-----------------------	----------------------

5-1	Pamoic	DMSO	Dung dịch màu vàng	Dung dịch màu vàng	Gôm màu vàng
5-2	Malonic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-3	D-glucuronic	Nước	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-4	DL-mandelic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-5	D-gluconic	THF	Kết tủa màu trắng	Dung dịch đục	Gôm trong
5-6	Glycolic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-7	L-lactic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-8	Oleic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-9	L-ascorbic	Nước	Dung dịch	Dung dịch	Gôm màu vàng
5-10	Adipic	THF (nhiệt)	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-11	Caproic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
5-12	Stearic	THF	Dung dịch	Dung dịch đục	Chất rắn dạng thủy tinh trong*
5-13	Palmitic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Chất rắn dạng thủy tinh trong*

5-14	Metansulfonic	THF	Dung dịch	Dung dịch	Gôm trong
------	---------------	-----	--------------	-----------	-----------

Dung dịch gốc được điều chế trước khi bổ sung axit

*Các mẫu được phân tích bằng XRPD và cho các mẫu vô định hình cùng với các đỉnh từ ion trái dấu axit

Do tất cả các mẫu là vô định hình, tất cả các mẫu được hòa tan lại trong MEK (5 vol) và xyclohexan được bổ sung (20 vol đối dung môi) ở nhiệt độ trong phòng tiếp theo là 1 giờ khuấy ở 25 °C. Tiếp theo, các mẫu được làm chín muối giữa 50 – 5 °C (1 °C/phút giữa các nhiệt độ, 4 giờ ở mỗi nhiệt độ) trong 2 ngày trước khi chu kỳ được thay đổi thành 50 - 25 °C trong 4 ngày nữa. Các mẫu được quan sát bằng mắt thường sau chín muối. Kết quả được thể hiện trong Bảng 15. Sau khi chín muối, tất cả các mẫu ngoại trừ 5-1 (với axit pamoic) được phát hiện là gôm. Mẫu 5-1, một chất rắn màu vàng, được phân tích bằng XRPD, và được phát hiện là khớp với dạng đã biết của axit pamoic (FIG. 14B), và do đó không thu được dạng tinh thể nào của muối.

Bảng 15. Kết quả từ việc hòa tan lại Hợp chất 1 trong MEK (5 thể tích) và đối dung môi

Ký hiệu mẫu	Quan sát ngay	Quan sát sau 10 phút	Quan sát sau 60 phút	Quan sát sau Chín muối
5-1	Kết tủa	Gôm	Gôm	Huyền phù màu vàng**
5-2	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm
5-3	Kết tủa/gôm	Gôm	Gôm	Gôm
5-4	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm
5-5	Kết tủa/gôm	Gôm	Gôm	Gôm
5-6	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm
5-7	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm
5-8	Kết tủa	Huyền phù sáng	Gôm	Gôm
5-9	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm
5-10	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm

5-11	Kết tủa	Huyền phù sáng	Gôm	Gôm
5-12	Kết tủa	Huyền phù sáng	Gôm	Gôm
5-13	Kết tủa	Huyền phù sáng	Gôm	Gôm
5-14	Kết tủa	Gôm	Gôm	Gôm

**Mẫu được phân tích bằng XRPD với mẫu khớp với dạng đã biết của axit pamoic (không có đỉnh bổ sung)

Ví dụ 10. Không thể thu được sự tạo muối đầy đủ bằng cách sử dụng etyl axetat

Tiếp theo, etyl axetat được sử dụng để nghiên cứu các muối thích hợp không phải muối hemi-sulfat. Sử dụng 14 ion trái dấu axit trong bảng 12, nghiên cứu được thực hiện bằng cách hòa tan Hợp chất 1 (50 mg) trong etyl axetat (20 vol) ở 50 °C. Dung dịch được xử lý bằng 1 đương lượng ion trái dấu đã chọn (Bảng 12). Tiếp theo, các mẫu được làm lạnh xuống 5 °C ở 0,1 °C/phút và được khuấy ở nhiệt độ này trong 4 ngày. Các dung dịch được cho bay hơi trong điều kiện môi trường trong khi chất rắn bất kỳ được phân tích bằng XRPD. Kết quả từ các quá trình kết tinh bằng cách sử dụng etyl axetat được thể hiện trong bảng 16. Ngược với Ví dụ 8 trong đó MEK là dung môi, đa số các mẫu được quan sát là huyền phù sau khi làm lạnh hỗn hợp axit:hợp chất (là các dung dịch được cho bay hơi trong điều kiện môi trường). Tuy nhiên, ảnh nhiễu xạ XRPD thường được phát hiện là khớp với Hợp chất 1 dạng tinh thể. Các mẫu 6-2, 6-4, và 6-5 có khác biệt không đáng kể (FIG. 14A và FIG. 15A). Không có dạng tinh thể nào của muối được thu.

Bảng 16. Kết quả từ hòa tan Hợp chất 1 trong EtOAc (20 thể tích)

Ký hiệu mẫu	Axit	Dung môi đối với axit ở 1 M	Quan sát khi bổ sung axit	Quan sát khi làm lạnh	XRPD	Quan sát khi bay hơi
6-1	Pamoic	DMSO	Dung dịch màu vàng	Dung dịch màu vàng*	-	Gôm
6-2	Malonic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Khác biệt không đáng kể so	-

					với bazơ tự do	
6-3	D-glucuronic	Nước	Dung dịch	Dung dịch*	-	Gôm
6-4	DL-mandelic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Khác biệt không đáng kể so với bazơ tự do	-
6-5	D-gluconic	THF	Kết tủa màu trắng	Có thể có gôm trắng	Khác biệt không đáng kể so với bazơ tự do	-
6-6	Glycolic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-
6-7	L-lactic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-
6-8	Oleic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-
6-9	L-ascorbic	Nước	Dung dịch	Dung dịch*	-	Chất rắn màu trắng trên thành / gôm màu vàng - vô định hình
6-10	Adipic	THF (nhiệt)	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-
6-11	Caproic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-
6-12	Stearic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-

6-13	Palmitic	THF	Dung dịch	Huyền phù màu trắng	Bazơ tự do	-
6-14	Metansulfonic	THF	Kết tủa màu trắng	Dung dịch / gôm trong*	-	Gôm trong

Ví dụ 11. Xác định độ tinh khiết hóa học bằng HPLC

Việc phân tích độ tinh khiết trong Ví dụ 2 và Ví dụ 4 được thực hiện trên hệ thống Agilent HP1100 có lắp bộ dò mảng diot và bằng cách sử dụng phần mềm ChemStation vB.04.03 bằng cách sử dụng phương pháp được thể hiện trong bảng 17.

Bảng 17. Phương pháp HPLC để xác định độ tinh khiết hóa học

Thông số	Valu		
Loại phương pháp	Đảo pha có giải hấp theo gradien		
Điều chế mẫu	0,5 mg/ml trong axetonitril : nước 1:1		
Cột	Supelco Ascentis Express C18, 100 x 4,6 mm, 2,7 μ m		
Nhiệt độ cột (°C)	25		
Tiêm (μ l)	5		
Bước sóng, chiều rộng dải (nm)	255, 90		
Lưu lượng (ml/phút)	2		
Pha A	0,1% TFA trong nước		
Pha B	0,085% TFA trong axetonitril		
Thời gian biểu	Thời gian (phút)	% Pha A	% Pha B
	0	95	5
	6	5	95
	6,2	95	5
	8	95	5

Ví dụ 12. Kỹ thuật nhiễu xạ bột tia X (XRPD)

Các mẫu XRPD trong Ví dụ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, và 9 được thu thập bằng nhiễu xạ kế PANalytical Empyrean bằng cách sử dụng bức xạ Cu K α (45 kV, 40 mA) theo hình học truyền dẫn. Khe 0,5°, màn chắn 4 mm và khe Soller 0,4 rad với gương điều tiêu được sử dụng trên chùm tới. Bộ dò PIXcel^{3D}, đặt trên trục nhiễu xạ, được lắp với khe nhận và khe Soller 0,04 rad. Thiết bị này được kiểm tra hiệu năng bằng cách sử dụng bột silic trên cơ sở hàng tuần. Phần mềm được sử dụng để thu dữ liệu là X'Pert Data

Collector v. 5.3 và dữ liệu được phân tích và thể hiện bằng cách sử dụng *DiffraC Plus* EVA v. 15.0.0.0 hoặc *Highscore Plus* v. 4.5.

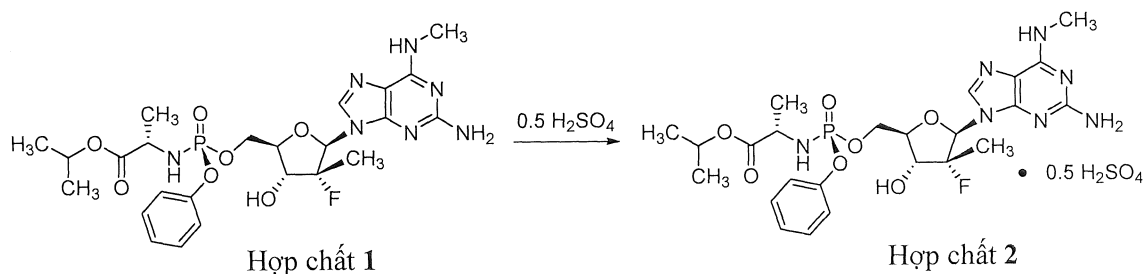
Các mẫu được điều chế và phân tích trong đĩa kim loại hoặc đĩa Millipore 96 lỗ theo kiểu truyền qua. Phim tia X trong suốt được sử dụng giữa các tấm kim loại trên đĩa lỗ kim loại và bột (khoảng 1-2 mg) được sử dụng khi nhận được. Đĩa Millipore được sử dụng để tách và phân tích chất rắn từ huyền phù bằng cách bổ sung trực tiếp lượng nhỏ huyền phù vào đĩa trước khi lọc trong điều kiện chân không nhẹ.

Kiểu quét đối với tấm kim loại sử dụng trục quét góc, trong khi quét 2 θ được ứng dụng cho đĩa Millipore. Việc kiểm tra hiệu năng được thực hiện bằng cách sử dụng bột silic (đĩa lỗ kim loại). Các chi tiết thu thập dữ liệu là giới hạn góc nằm trong khoảng từ 2,5 đến 32,0° 2 θ , kích thước bước 0,0130° 2 θ , và tổng thời gian thu thập 2,07 phút.

Các mẫu cũng được thu bằng nhiễu xạ kế Bruker D8 bằng cách sử dụng bức xạ Cu K α (40 kV, 40 mA), máy đo góc θ - 2 θ , và phân kỳ V4 và các khe nhận, máy đơn sắc Ge và bộ dò Lynxeye. Thiết bị được kiểm tra hiệu năng bằng cách sử dụng chuẩn Corindon đã được chứng nhận (NIST 1976). Phần mềm được sử dụng để thu dữ liệu là *DiffraCPlus* XRD Commander v2.6.1 và dữ liệu được phân tích và thể hiện bằng cách sử dụng *DiffraC Plus* EVA v15.0.0.0.

Các mẫu được chạy trong điều kiện môi trường dưới dạng các mẫu thử dạng đĩa dẹt bằng cách sử dụng bột khi nhận được. Mẫu được ấn nhẹ vào khoang đã cắt thành miếng silic đánh bóng, mốc không (510). Mẫu được quay theo mặt phẳng riêng của nó trong khi phân tích. Các chi tiết thu thập dữ liệu là giới hạn góc nằm trong khoảng từ 2 đến 42° 2 θ , kích thước bước 0,05° 2 θ , và thời gian thu thập 0,5 s/bước.

Ví dụ 13. Tổng hợp Hợp chất 2 vô định hình



Bình nón 250 mL được nạp MeOH (151 mL) và dung dịch này được làm lạnh đến 0-5 °C. Dung dịch H₂SO₄ đặc được bổ sung bằng cách nhỏ giọt trong 10 phút. Bình nón riêng được nạp Hợp chất 1 (151 g) và axeton (910 mL), và dung dịch H₂SO₄/MeOH được bổ sung bằng cách nhỏ giọt ở 25-30 °C trong 2,5 giờ. Lượng lớn chất rắn được kết tủa. Sau khi dung dịch được khuấy trong 12-15 giờ ở 25-30 °C, hỗn hợp được lọc, được rửa bằng MeOH/axeton (25 mL/150 mL), và được sấy khô ở 55-60 °C trong chân không thu được Hợp chất 2 (121 g, 74%).

Phương pháp phân tích đối với Hợp chất 2: Độ tinh khiết của Hợp chất 2 được thu bằng cách sử dụng hệ thống HPLC Agilent 1100 có lắp cột Waters XTerra Phenyl 5µm 4,6*250mm với các điều kiện sau: lưu lượng 1 mL/phút, đọc ở 254 nm, nhiệt độ cột 30 °C, thể tích tiêm 10 µL, và thời gian chạy 30 phút. Mẫu được hòa tan trong ACN:nước (90:10, v/v). Phương pháp tách theo gradien được thể hiện dưới đây. R_t (phút) của Hợp chất 2 là khoảng 12,0 phút.

Thời gian (phút)	0,1% H ₃ PO ₄ trong nước (A)%	Axetonitril (B)%
0	90	10
20	20	80
20,1	90	10
30	90	10

¹HNMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,41 (br, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,36 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,22 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,17 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,73 (s, 2H), 6,07 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,00 (dd, *J* = 12,0, 8,0 Hz, 1H), 5,81 (br, 1H), 4,84-4,73 (m, 1H), 4,44-4,28 (m, 3H), 4,10 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,85-3,74 (m, 1H), 2,95 (s, 3H), 1,21 (s, *J* = 4,0 Hz, 3H), 1,15-1,10 (m, 9H).

Ví dụ 14. Xác định Hợp chất 2

Hợp chất 2 cũng được xác định bằng mắt thường, ¹HNMR, ¹³CNMR, ¹⁹FNMR, MS, HPLC, và XRPD (FIG. 15B). Dung môi dư được đo bằng GC. Hàm lượng nước được đo bằng chuẩn độ Karl Fischer, và hàm lượng nước chỉ là 0,70%. Số liệu được tóm tắt trong bảng 18.

Bảng 18. Tóm tắt số liệu xác định bổ sung của Hợp chất 2

Thử nghiệm	Kết quả
Bề ngoài	Chất rắn màu trắng
NMR	Các đỉnh $^1\text{HNMR}$ được nêu trong Ví dụ 4
MS	MS(ESI+ve) $[M+H]^+ = 582,3$ – phù hợp với cấu trúc
HPLC	99,8% theo AUC ở 254 nm (trung bình của hai mẻ)
Dung môi dư xác định bằng GC	Metanol – 57 ppm Axeton – 752 ppm Diclometan – 50 ppm Etyl axetat – 176 ppm
Hàm lượng nước	0,70%

Ví dụ 15. Độ tan của Hợp chất 1 và Hợp chất 2

Hợp chất 1 và Hợp chất 2 đều được thử độ tan trong các môi trường thử nghiệm tương thích sinh học, bao gồm dịch dạ dày mô phỏng (SGF), dịch dạ dày mô phỏng ở trạng thái đói (FaSSIF), và dịch dạ dày ở trạng thái no (FeSSIF). Kết quả đối với Hợp chất 1 được thể hiện trong Bảng 19 và kết quả đối với Hợp chất 2 được thể hiện trong Bảng 20. Các mẫu được khuấy ở nhiệt độ trong phòng (20 – 25 °C). Hợp chất 2 có độ tan cao gấp 40 lần so với Hợp chất 1 trong nước ở 2 giờ và cao gấp 25 lần ở 24 giờ. Trong điều kiện SGF, Hợp chất 2 có độ tan 84,2 mg/mL ở 24 giờ so với độ tan 15,6 mg/mL của Hợp chất 1 tại cùng thời điểm. Hợp chất 2 cũng có độ tan cao hơn ở 2 giờ trong điều kiện SGF so với Hợp chất 1, và đủ tan để cho phép thử nghiệm thậm chí sau 48 giờ trong khi thử nghiệm ở 48 giờ là không thực hiện được đối với Hợp chất 1.

Bảng 19. Kết quả thử nghiệm độ tan của Hợp chất 1

Môi trường thử nghiệm	Độ tan (tính bằng mg/mL)		Bề ngoài	Mô tả
	2 giờ	24 giờ		

Nước	1,5	2,5	Dung dịch trong*	Tan không đáng kể
SGF	13,8	15,6	Dung dịch trong có gồm ở đáy	Ít tan
FaSSIF	1,7	1,7	Đục	Tan không đáng kể
FeSSIF	2,8	2,9	Đục	Tan không đáng kể

*Mẫu có vẻ trong, nhưng độ tan đạt được chỉ là 1,5 mg/mL. Khi nghiên cứu tiếp, thấy rằng có màng dạng gồm trên que khuấy. Hợp chất 1 (hoạt chất được) tạo viên dạng gồm trong chất pha loãng (90% nước/10% axetonitril) trong khi chế phẩm chuẩn cần đến thời gian tác động sóng âm dài để hòa tan hoàn toàn.

Bảng 20. Kết quả thử nghiệm độ tan của Hợp chất 2

Môi trường thử nghiệm	Độ tan (tính bằng mg/mL bazơ muối)			Bề ngoài	Mô tả
	2 giờ	24 giờ	48 giờ		
Nước	65,3	68,0	N/A	Đục	Tan
SGF	89,0	84,2	81,3	Đục	Tan
FaSSIF	1,9	2,0	N/A	Đục	Tan không đáng kể
FeSSIF	3,3	3,4	N/A	Đục	Tan không đáng kể

Ví dụ 16. Độ ổn định hóa học của Hợp chất 2

Hợp chất 2 được thử nghiệm về độ ổn định hóa học ở 25 và 40 °C trong khoảng thời gian 6 tháng bằng cách theo dõi độ tinh khiết hữu cơ, hàm lượng nước, ¹HNMR, DSC, và Ramen IR. Hệ thống đóng kín vật đựng đối với nghiên cứu này là túi van đưng

thuốc có màng nhiều lớp trên túi và silicagel hút ẩm giữa hai lớp. Hợp chất **2** (1 g) được đo trong mỗi vật đựng. Tiếp theo, túi được bảo quản ở 25°C/60%RH (độ ẩm tương đối) và 40°C/75%RH (độ ẩm tương đối). Độ tinh khiết hữu cơ, hàm lượng nước, ¹HNMR, DSC và Raman được đo ở thời điểm 0, Tháng 1, Tháng 2, Tháng 3 và Tháng 6.

Độ tinh khiết của Hợp chất **2** được thu bằng cách sử dụng hệ thống Shimadzu LC-20AD có cột Waters XTerra Phenyl, 5µm, 4,6x250mm với các điều kiện sau: lưu lượng 1 mL/phút, đọc ở 254 nm, nhiệt độ cột 35 °C, và thể tích tiêm 10 µL. Mẫu được hòa tan trong axetonitril – nước (90:10) (v/v). Phương pháp gradien được thể hiện dưới đây.

Thời gian (phút)	A% (ACN)	B% (nước)
0	90	10
20	20	80
20,1	90	10
30	90	10

Hàm lượng nước của Hợp chất **2** (250 mg) được xác định thiết bị chuẩn độ nước bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn độ Karl Fischer.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 21 và Bảng 22. Khi Hợp chất **2** được bảo quản trong 6 tháng ở 25 và 40 °C, tỷ lệ phân hủy là tối thiểu. Ở 3 tháng, Hợp chất **2** có phần trăm tinh khiết 99,75% ở điều kiện 25 °C và 99,58% tinh khiết ở điều kiện 40 °C. Ở 6 tháng, Hợp chất **2** vẫn có độ tinh khiết 99,74% ở điều kiện 25 °C và 99,30% tinh khiết ở điều kiện 40 °C. Ở 25 °C, phần trăm sản phẩm phân hủy tăng từ 0,03% ở ngày 0 đến 0,08% sau 6 tháng. Ở 40 °C, phần trăm sản phẩm phân hủy tăng từ 0,03% đến 0,39%. Trong khoảng thời gian 6 tháng, phần trăm nước tăng khoảng 0,6% ở 25 °C và tăng khoảng 0,7% ở 40 °C.

Việc xác định bằng ¹HNMR, Raman, và DSC đối với Hợp chất **2** ở 1, 2, 3, và 6 tháng là giống như việc xác định Hợp chất **2** ở ngày 0 ở cả hai điều kiện nhiệt độ (Bảng 22), làm nổi bật độ ổn định trong thời gian dài của Hợp chất **2**.

Bảng 21. Tỷ lệ phân hủy Hợp chất **2** trong 6 tháng ở 25 và 40 °C

	Thời gian thử nghiệm	Phần trăm nước	Phần trăm tinh khiết	Phần trăm sản phẩm phân hủy	Phần trăm tạp chất tối đa
25 °C	Ngày 0	1,2	99,82	0,03	0,12
	Tháng 1	1,9	99,77	0,04	0,12
	Tháng 2	1,8	99,75	0,06	0,12
	Tháng 3	1,8	99,75	0,06	0,12
	Tháng 6	1,8	99,74	0,08	0,13
40 °C	Ngày 0	1,2	99,82	0,03	0,12
	Tháng 1	2,0	99,71	0,09	0,12
	Tháng 2	1,9	99,63	0,15	0,12
	Tháng 3	1,9	99,58	0,20	0,12
	Tháng 6	1,9	99,30	0,39	0,14

Bảng 22. Xác định Hợp chất **2** trong khi nghiên cứu sự phân hủy

	Thời gian thử nghiệm	¹ HNMR	Raman	DSC
25 °C	Ngày 0	Thử nghiệm ban đầu	Thử nghiệm ban đầu	Thử nghiệm ban đầu
	Tháng 1	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0

	Tháng 2	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0
	Tháng 3	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0
	Tháng 6	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0
40 °C	Ngày 0	Thử nghiệm ban đầu	Thử nghiệm ban đầu	Thử nghiệm ban đầu
	Tháng 1	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0
	Tháng 2	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0
	Tháng 3	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0
	Tháng 6	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0	Giống như ngày 0

Các nghiên cứu bổ sung về độ ổn định hóa học của Hợp chất **2** được thực hiện để xác định các mức tạp chất và nước. Ba điều kiện được thử nghiệm là: độ ổn định tăng tốc ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ RH) trong khoảng thời gian 6 tháng, độ ổn định trong điều kiện môi trường ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ / $60 \pm 5\%$ RH) trong khoảng thời gian 9 tháng, và độ ổn định trong điều kiện lạnh ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) trong khoảng thời gian 9 tháng. Kết quả đối với độ ổn định tăng tốc, độ ổn định trong điều kiện môi trường, và điều kiện lạnh lần lượt được thể hiện trong Bảng 23, Bảng 24, và Bảng 25. Dựa trên kết quả của các nghiên cứu này, Hợp chất **2** là rất ổn định hóa học.

Trong nghiên cứu về độ ổn định tăng tốc (Bảng 23), tại mỗi thời điểm (tháng 1, tháng 3, và tháng 6) Hợp chất **2** được đo, bề ngoài của Hợp chất **2** luôn là chất rắn màu trắng và IR khớp với chuẩn tham chiếu. Sau sáu tháng, tổng lượng tạp chất liên quan 1 chỉ là 0,08% và không phát hiện được chất liên quan 2 và các chất đồng phân.

Bảng 23. Độ ổn định tăng tốc ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ / $75 \pm 5\%$ RH) của Hợp chất **2**

Các khoản		Mô tả	Thời điểm thử nghiệm			
			Tháng 0	Tháng 1	Tháng 3	Tháng 6
Bề ngoài		Chất rắn màu trắng hoặc trắng nhạt	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng
IR		tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu	/	tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu
Nước		≤2,0%	0,45%	0,21%	0,36%	0,41%
Chất liên quan 1	Tạp chất A	≤0,15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất B	≤0,15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất F	≤0,15%	N.D.	N.D.	N.D.	0,01%
	Tạp chất H	≤0,15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất duy nhất khác bất kỳ	≤0,10%	0,01%	0,02%	0,01%	0,05%
	Tổng lượng tạp chất	≤0,2%	0,01%	0,02%	0,02%	0,08%
Chất liên quan 2	Tạp chất G	≤0,15%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Chất đồng phân	Tạp chất C	≤0,15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	Tạp chất D	≤0,15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
	Tạp chất E	≤0,15%	N.D.	/	N.D.	N.D.
Thử nghiệm		98,0%~102,0%	98,8%	101,5%	99,6%	99,5%
Thử nghiệm	TAMC	≤1000cfu/g	<1cfu/g	/	/	/
	Mốc và nấm	≤100cfu/g	<1cfu/g	/	/	/

vi sinh	men					
vật	E.Coli	Không phát hiện được	N.D.	/	/	/

N.D.: Không phát hiện được

Trong nghiên cứu về độ ổn định trong điều kiện môi trường với bề ngoài, IR, các mức nước và tạp chất được đo trong 9 tháng, bề ngoài của Hợp chất 2 luôn là chất rắn màu trắng và IR luôn tương ứng với mẫu tham chiếu. Kết quả (Bảng 24) làm nổi bật Hợp chất 2 ổn định hóa học như thế nào. Sau 9 tháng, phần trăm nước trong mẫu chỉ là 0,20% và tổng lượng tạp chất liên quan 1 chỉ là 0,02%. Giống như các nghiên cứu về độ ổn định tăng tốc, chất liên quan 2 và chất đồng phân bất kỳ của Hợp chất 2 là không phát hiện được.

Bảng 24. Độ ổn định trong điều kiện môi trường ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60 \pm 5\%$ RH) của Hợp chất 2

Các khoản		Mô tả	Thời điểm thử nghiệm				
			Tháng 0	Tháng 1	Tháng 3	Tháng 6	Tháng 9
Bề ngoài		Chất rắn màu trắng hoặc trắng nhạt	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng nhạt
IR		tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu	/	tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu
Nước		$\leq 2,0\%$	0,45%	0,19%	0,29%	0,46%	0,20%
Chất liên quan 1	Tạp chất A	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất B	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	0,03%	N.D.	N.D.

	Tạp chất F	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	0,02%	0,01%	N.D.
	Tạp chất H	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất duy nhất khác bất kỳ	$\leq 0,10\%$	0,01%	0,01%	0,03%	0,02%	0,02%
	Tổng lượng tạp chất	$\leq 0,2\%$	0,01%	0,02%	0,11%	0,05%	0,02%
Chất liên quan 2	Tạp chất G	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Chất đồng phân	Tạp chất C	$\leq 0,15\%$	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất D	$\leq 0,15\%$	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất E	$\leq 0,15\%$	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
Thử nghiệm		98,0%~102,0%	98,8%	101,1%	99,6%	99,7%	100,9%
Thử nghiệm vi sinh vật	TAMC	$\leq 1000\text{cfu/g}$	$< 1\text{cfu/g}$	/	/	/	/
	Mốc và nấm men	$\leq 100\text{cfu/g}$	$< 1\text{cfu/g}$	/	/	/	/
	E.Coli	Không phát hiện được	N.D.	/	/	/	/

N.D.: Không phát hiện được

Kết quả đo độ ổn định trong điều kiện lạnh được thể hiện trong Bảng 25. Chỉ các tạp chất được phát hiện thậm chí sau 9 tháng là các tạp chất từ chất liên quan 1 và nước. Hàm lượng nước sau 9 tháng là 0,32% và tổng lượng tạp chất liên quan 1 chỉ là 0,01% mẫu. Hợp chất 2 là rất ổn định hóa học trong điều kiện lạnh.

Bảng 25. Độ ổn định trong điều kiện lạnh ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) của Hợp chất 2

Các khoản		Mô tả	Thời điểm thử nghiệm				
			Tháng 0	Tháng 1	Tháng 3	Tháng 6	Tháng 9
Bề ngoài		Chất rắn màu trắng hoặc trắng nhạt	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng	Chất rắn màu trắng nhạt
IR		tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu	/	tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu	tương đương với chuẩn tham chiếu
Nước		$\leq 2,0\%$	0,45%	0,19%	0,32%	0,42%	0,32%
Chất liên quan 1	Tạp chất A	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất B	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	0,01%	N.D.	N.D.
	Tạp chất F	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất H	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất duy nhất	$\leq 0,10\%$	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%

	khác bất kỳ						
	Tổng lượng tạp chất	$\leq 0,2\%$	0,01%	0,01%	0,03%	0,03%	0,01%
Chất liên quan 2	Tạp chất G	$\leq 0,15\%$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Chất đồng phân	Tạp chất C	$\leq 0,15\%$	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất D	$\leq 0,15\%$	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
	Tạp chất E	$\leq 0,15\%$	N.D.	/	N.D.	N.D.	N.D.
Thử nghiệm		98,0%~102,0%	98,8%	101,1%	100,2%	98,6%	101,4%
Thử nghiệm vi sinh vật	TAMC	$\leq 1000\text{cfu/g}$	$< 1\text{cfu/g}$	/	/	/	/
	Mốc và nấm men	$\leq 100\text{cfu/g}$	$< 1\text{cfu/g}$	/	/	/	/
	E.Coli	Không phát hiện được	N.D.	/	/	/	/

N.D.: Không phát hiện được

Ví dụ 17. Các mức trong huyết tương của chất chuyển hóa sau các liều đơn dùng qua đường miệng của Hợp chất 2

Liều đơn dùng qua đường miệng của Hợp chất 2 được dùng cho chuột cống, chó, và khỉ, và các mức trong huyết tương của chất chuyển hóa như được thể hiện trong Sơ đồ 1 được đo.

Sự chuyển hóa của Hợp chất 2 thành Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 được thể hiện trong Bảng 26 và kết quả đối với chất chuyển hóa 1-8 và chất chuyển hóa 1-2 được thể hiện trong Bảng 27. Ở chuột cống, mức biểu hiện thấp của Hợp chất 1 được ghi nhận, nhưng mức cao của chất chuyển hóa 1-7, chất chuyển hóa dạng nucleosit của triphosphat hoạt tính (chất chuyển hóa 1-6), được ghi nhận. Ở khỉ, mức biểu hiện hầu như tỷ lệ với liều của Hợp chất 1 là được đo. Ở chó, mức biểu hiện siêu tỷ lệ Hợp chất 1, chỉ thị sự thanh thải chuyển hóa qua gan lần đầu, được đo. Trong nghiên cứu này, nôn mửa ở chó cao hơn đáng kể (5/5 trong nhóm liều cao) so với ở khỉ (1/5 trong nhóm liều cao) được ghi nhận.

Bảng 26. Các mức trong huyết tương của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 sau liều đơn dùng qua đường miệng của Hợp chất 2

Loài	Liều* (mg/kg)	Hợp chất 1			Chất chuyển hóa 1-7	
		C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)
Chuột cống ^a	500	70,5	0,25	60,9	748	12000
Chó ^b	30	1530	0,25-1	1300	783	9270
	100	8120	0,5-1	10200	2030	24200
	300	21300	204	44300	4260	60800
Khỉ ^b	30	63,5	0,5-2	176	42,5	1620
	100	783	1-2	1100	131	3030
	300	501	204	1600	93,6	3660

3 con đực/liều/loài; *công thức liều: ^a0,5% CMC, 0,5% Tween 80 trong nước; ^bbột trong viên nang

Bảng 27. Các mức trong huyết tương của các chất chuyển hóa 1-8 và 1-2 sau liều đơn dùng qua đường miệng của Hợp chất 2

Loài	Liều* (mg/kg)	Chất chuyển hóa 1-8		Chất chuyển hóa 1-2	
		C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-last} (hr*ng/mL)
Chuột cống ^a	500	5060	35100	9650	20300
Chó ^b	30	291	905	196	610
	100	1230	4370	886	2830
	300	5380	35300	2380	8710
Khỉ ^b	30	209	5690	300	1730
	100	406	12300	1350	8160
	300	518	16800	1420	11400

3 con đực/liều/loài; *công thức liều: ^a0,5% CMC, 0,5% Tween 80 trong nước;

^bbột trong viên nang

Ví dụ 18. Biểu hiện trong mô của Triphosphat hoạt tính sau liều dùng qua đường miệng của Hợp chất 2

Các mức trong mô tim và gan của triphosphat hoạt tính (TP) của Hợp chất 2 (chất chuyển hóa 1-6) là được đo 4 giờ sau các liều dùng qua đường miệng của Hợp chất 2. Các mẫu gan và tim được thu ở 4 giờ sau liều đơn của Hợp chất 2, được làm đông nhanh, được làm đồng nhất và được phân tích bằng LC-MS/MS về mức nội bào của TP hoạt tính. Các mức trong mô được đo ở chuột cống, chó và khỉ như được thể hiện trên FIG. 16A. Mức cao của TP hoạt tính được đo trong gan của tất cả các loài được thử nghiệm. Mức tương đối thấp của TP hoạt tính được đo trong tim của chó do sự bão hòa chuyển hóa qua gan lần đầu, và mức không định lượng được của TP được đo trong tim của chuột cống và khỉ, chỉ thị sự tạo TP hoạt tính đặc hiệu gan. Mặc dù không được thể hiện, so với định liều Hợp chất 1, định liều Hợp chất 2 cải thiện sự phân bố TP.

Ví dụ 19. So sánh dược lý của Hợp chất 1 và Hợp chất 2 ở chó

Việc so sánh trực tiếp các con chó được định liều Hợp chất 1 và Hợp chất 2 được thực hiện. Nghiên cứu này đo mức trong huyết tương của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 (từ Sơ đồ 1) đến 4 giờ sau khi định liều Hợp chất 1 (25 mg/kg) và Hợp chất 2 (30 mg/kg) (Bảng 28), và $AUC_{(0-4hr)}$ của chất chuyển hóa 1-7 là cao gấp hai lần với Hợp chất 2 so với Hợp chất 1. Các mức chuẩn hóa theo liều đối với Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 được thể hiện trong Bảng 28. Giá trị $AUC_{(0-4hr)}$ đối với Hợp chất 1, chất chuyển hóa 1-7, và tổng của Hợp chất 1 + chất chuyển hóa 1-7 là lớn hơn sau khi định liều Hợp chất 2.

Bảng 28. So sánh mức trong huyết tương sau khi định liều Hợp chất 1 và Hợp chất 2

Hợp chất được định liều	$AUC_{(0-4hr)}$ chuẩn hóa theo liều trung bình ^a ($\mu M \cdot hr$) đối với:		
	Hợp chất 1	Chất chuyển hóa 1-7	Hợp chất 1 + Chất chuyển hóa 1-7
Hợp chất 1 (25 mg/kg)	0,2	1,9	2,1
Hợp chất 2 (30 mg/kg)	1,0	4,1	5,1

^a Giá trị $AUC_{(0-4hr)}$ được chuẩn hóa theo liều 25 mg/kg

Nồng độ triphosphat theo tỷ lệ gan/tim chỉ ra rằng việc định liều Hợp chất 2, so với Hợp chất 1, làm tăng sự phân phối chọn lọc triphosphat đến gan, như được thể hiện trong Bảng 29. $AUC_{(0-4hr)}$ của chất chuyển hóa dạng guanin hoạt tính (1-6) sau khi dùng Hợp chất 1 đo được trong tim là $174 \mu M \cdot hr$, trong khi $AUC_{(0-4hr)}$ của chất chuyển hóa dạng guanin hoạt tính (1-6) sau khi dùng Hợp chất 2 đo được trong tim là $28 \mu M \cdot hr$. Tỷ lệ gan/tim đối với Hợp chất 2 là 20 so với tỷ lệ gan/tim 3,1 đối với Hợp chất 1.

Bảng 29. So sánh mức biểu hiện trong gan và tim sau định liều Hợp chất 1 và Hợp chất 2

Hợp chất được định liều	AUC _(0-4hr) chuẩn hóa theo liều trung bình ^a (μM*hr) đối với:		
	Gan	Tim	Gan/Tim
Hợp chất 2	565	28 ^b	20
Hợp chất 1	537	174	3,1

^aNồng độ TP hoạt tính (1-6; Sơ đồ 1) được chuẩn hóa theo liều 25 mg/kg

^bNgoại suy ở dưới giới hạn dưới định lượng của đường cong hiệu chỉnh

Tác dụng của tính chọn lọc gan tăng so với tim khi Hợp chất 2 được dùng so với Hợp chất 1 cũng được thể hiện trên FIG. 16B. Các mức trong mô tim và gan của triphosphat hoạt tính sau khi định liều Hợp chất 2 (30 mg/kg) được so sánh với các mức trong mô của triphosphat hoạt tính sau khi định liều Hợp chất 1 (25 mg/kg). Nồng độ của TP hoạt tính trong gan là cao hơn so với trong tim đối với cả hai Hợp chất 1 và Hợp chất 2, nhưng TP hoạt tính có tính chọn lọc gan cao hơn so với tim khi Hợp chất 2 được định liều so với Hợp chất 1.

Ví dụ 20. Profin huyết tương của các chất chuyển hóa Hợp chất 2 ở chuột cống và khi

Chuột cống Sprague-Dawley đực và khi đuôi dài (3 con/nhóm liều) được dùng qua đường miệng liều đơn của Hợp chất 2. Các phần mẫu huyết tương điều chế từ các mẫu máu được xử lý bằng Dichlorvos được phân tích bằng LC-MS/MS về nồng độ của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 (chất chuyển hóa dạng nucleosit của triphosphat hoạt tính của Hợp chất 2 thể hiện trong Sơ đồ 1), và các thông số dược động học được xác định bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin. Kết quả đối với liều đơn 500 mg/kg ở chuột cống được thể hiện trên FIG. 17 và kết quả đối với liều đơn 30, 100, hoặc 300 mg/kg ở khi được thể hiện trên FIG. 18. Các kết quả cũng được tóm tắt trong Bảng 30.

Các mức cao trong huyết tương của chất chuyển hóa 1-7, chất chuyển hóa dạng nucleosit của triphosphat hoạt tính (TP) của Hợp chất 2, là chỉ thị sự tạo TP ở mức cao, thậm chí ở các con chuột cống được ghi nhận là có mức tiền dược chất nucleotit gốc rất thấp trong huyết tương do thời gian bán hủy ngắn của Hợp chất 1 trong máu chuột cống (<2 phút). Mức ổn định trong huyết tương của chất chuyển hóa 1-7 phản ánh thời gian bán hủy dài của TP.

Ở khi, mức biểu hiện trong huyết tương (AUC) của Hợp chất 1 là hầu như tỷ lệ với liều, trong khi mức biểu hiện chất chuyển hóa 1-7 là có phần nhỏ hơn tỷ lệ với liều, mặc dù các giá trị AUC đối với cả dược chất gốc và chất chuyển hóa dạng nucleosit của TP hoạt tính tiếp tục tăng lên đến liều cao nhất được thử nghiệm (300 mg/kg).

Việc dùng Hợp chất 2 qua đường miệng ở các con chuột cống và khi tạo ra các mức biểu hiện trong huyết tương cao và phụ thuộc liều đối với chất chuyển hóa 1-7 (chất chuyển hóa dạng nucleosit của triphosphat hoạt tính nội bào của Hợp chất 2); mức biểu hiện chất chuyển hóa 1-7 tiếp tục tăng lên đến liều cao nhất được thử nghiệm, phản ánh sự tạo TP hoạt tính đáng kể ở các loài này.

Bảng 30. Mức trong huyết tương của các hợp chất 1 và 1-7 sau liều đơn dùng qua đường miệng của Hợp chất 2

	Loài	Chuột cống ^a	Khi ^b		
	Liều (mg/kg)	500	30	100	300
Hợp chất 1	C_{max} (ng/mL)	60,8	63,5	783	501
	T_{max} (hr)	0,25	0,5-2	1-2	204
	AUC_{0-last} (hr*ng/mL)	78,2	176	1100	1600
Chất chuyển hóa 1-7	C_{max} (ng/mL)	541	42,5	131	93,6
	AUC_{0-last} (hr*ng/mL)	9640	1620	3030	3660
	T_{max} (hr)	6-8	12-24	4	4-24
	T_{1/2} (hr)	15,3	11,5	15,0	18,8

Công thức liều: ^a0,5% CMC, 0,5% Tween 80 trong nước; ^bbột trong viên nang

Ví dụ 21. Tác dụng của triphosphat hoạt tính của Hợp chất 1 và Hợp chất 2 đến tính toàn vẹn ty thể

Hiệu quả tương đối của việc hợp nhất triphosphat hoạt tính (TP) của Hợp chất 1 và Hợp chất 2, chất chuyển hóa 1-6 (Sơ đồ 1), bởi ARN polymeraza ty thể người được so sánh với hiệu quả tương đối của TP hoạt tính của sofosbuvir và TP hoạt tính của INX-189. Hợp chất 1 và Hợp chất 2 có vẻ không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của ty thể do triphosphat hoạt tính của chúng là được hợp nhất kém bởi ARN polymeraza ty thể người với hiệu quả giống như triphosphat của sofosbuvir; hiệu quả tương đối của việc hợp nhất triphosphat của INX-189 là cao gấp đến 55 lần. Kết quả được thể hiện trong Bảng 31. Việc hợp nhất các chất tương tự này bởi ARN polymeraza ty thể người phụ thuộc ARN (POLRMT) được xác định theo Arnold và các đồng tác giả (Sensitivity of Mitochondrial Transcription và Resistance of RNA polymerase II Dependent Nuclear Transcription to Antiviral Ribonucleotides. *PLoS Pathog.*, 2012, **8**, e1003030).

Bảng 31. Thông số động học đối với chất tương tự nucleotit được đánh giá bằng ARN polymeraza ty thể người

Chất tương tự nucleotit	$K_{pol} (s^{-1})$	$K_{d,app} (\mu M)$	$K_{pol}/K_{d,app} (\mu M^{-1}s^{-1})$	Hiệu quả tương đối*
2'-deoxy-2'-F-2'-C-metyl UTP (TP hoạt tính của sofosbuvir)	$0,00034 \pm 0,00005$	590 ± 250	$5,8 \times 10^{-7} \pm 2,6 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
2'-C-metyl GTP (TP hoạt tính của INX-189)	$0,051 \pm 0,002$	240 ± 26	$2,1 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$5,5 \times 10^{-5}$
TP hoạt tính của Hợp chất 1 và Hợp chất 2 (chất chuyển hóa 1-6)	$0,0017 \pm 0,0002$	204 ± 94	$8,3 \times 10^{-6} \pm 4,0 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$

*Hiệu quả tương đối = $(K_{pol}/K_{d,app})_{\text{nucleotit tương tự}} / (K_{pol}/K_{d,app})_{\text{nucleotit tự nhiên}}$

Ví dụ 22. Hoạt tính của Hợp chất 1 kháng các sản phẩm phiên mã chứa trình tự NS5B

Nhóm sản phẩm phiên mã chứa các trình tự NS5B từ các kiểu gen HCV có nguồn gốc từ 6 chủng tham chiếu phòng thí nghiệm (GT1a, 1b, 2a, 3a, 4a và 5a) (FIG. 19) và từ

8 mẫu huyết tương của bệnh nhân HCV (GT1a, 1b, 2a, 2b, 3a-1, 3a-2, 4a và 4d) (FIG. 20) được sử dụng để xác định hiệu nghiệm của Hợp chất 1 và sofosbuvir.

Hợp chất 1 là hiệu nghiệm hơn sofosbuvir kháng các chủng lâm sàng và chủng phòng thí nghiệm của HCV. Hợp chất 1 thể hiện hoạt tính kháng virus toàn kiểu gen *in vitro* kháng hiệu nghiệm các thể phân lập lâm sàng kiểu đại với $EC_{95} < 80$ nM, hiệu nghiệm gấp từ 4 đến 14 lần so với sofosbuvir. Như được thể hiện trên FIG. 20, các giá trị EC_{95} đối với Hợp chất 1 là thấp hơn 7-33 lần so với sofosbuvir kháng các thể phân lập lâm sàng của tất cả các kiểu gen HCV được thử nghiệm. Các giá trị EC_{50} đối với Hợp chất 1 là thấp hơn 6-11 lần so với sofosbuvir kháng các chủng phòng thí nghiệm của HCV kiểu gen 1-5 (FIG. 19).

Ví dụ 23. Nghiên cứu về liều đơn tăng dần (SAD) của Hợp chất 2 ở những người tự nguyện khỏe mạnh (Phần A) và bệnh nhân bị nhiễm GT1-HCV (Phần B)

Hợp chất 2 được thử nghiệm trong nghiên cứu về liều đơn tăng dần (SAD) để đo độ an toàn, tính dung nạp, và dược động học của nó ở các đối tượng khỏe mạnh (Part A). Phần A là nghiên cứu SAD ngẫu nhiên, mù kép, có đối chứng giả dược. Các đối tượng khỏe mạnh trong Phần A tiếp nhận liều đơn của Hợp chất 2 hoặc giả dược ở trạng thái đói. Các đối tượng được nhập viện từ ngày -1 đến ngày 6.

Việc định liều trong mỗi nhóm được xếp xen kẽ sao cho 2 đối tượng (1 hoạt chất: 1 giả dược) là được đánh giá trong 48 giờ sau định liều trước khi phần còn lại của nhóm được định liều. Mỗi nhóm tiếp nhận Hợp chất 2 theo thứ tự tăng dần. Việc định liều các nhóm theo sau diễn ra dựa trên việc xem xét số liệu độ an toàn khả dụng (qua ngày 5) và số liệu dược động học huyết tương (qua 24 h) của nhóm trước.

Tăng dần liều được tiến hành sau khi xem xét thỏa đáng số liệu này. Về số liệu dược động học và độ an toàn thu được từ các nhóm trước, các liều được đánh giá trong các Nhóm 3a-4a được điều chỉnh bằng các lượng gia tăng không vượt quá 100 mg. Tổng liều tối đa được đánh giá trong Phần A không vượt quá 800 mg. Chế độ liều đối với phần A được thể hiện trong bảng 32.

Bảng 32. Chế độ liều đối với dùng Hợp chất 2 ở Phần A của nghiên cứu

Nhóm	Quần thể	N (hoạt chất: giả dược)	Hợp chất 2 (Hợp chất 1)*
------	----------	-------------------------	--------------------------

1a	Khỏe mạnh	6:2	50 (45) mg x 1 ngày
2a	Khỏe mạnh	6:2	100 (90) mg x 1 ngày
3a	Khỏe mạnh	6:2	200 (180) mg x 1 ngày
4a	Khỏe mạnh	6:2	400 (360) mg x 1 ngày

*Liều lâm sàng được biểu diễn theo Hợp chất 2, với đương lượng bazơ Hợp chất 1 xấp xỉ trong ngoặc

Những người khỏe mạnh trong Phần A của nghiên cứu là các đối tượng nam và nữ giữa 18 và 65 tuổi. Các đối tượng nhận hoạt chất và giả dược được gộp vào mỗi nhóm Phần A nhằm đảm bảo nghiên cứu mù.

Hợp chất 2 cũng được thử nghiệm trong nghiên cứu về liều đơn tăng dần (SAD) để đo độ an toàn, tính dung nạp, dược động học, và hoạt tính kháng virus của nó ở bệnh nhân bị nhiễm HCV GT1 (Phần B). Đối tượng trong Phần B tiếp nhận liều đơn của Hợp chất 2 ở trạng thái đối. Bệnh nhân được nhập viện từ ngày -1 đến ngày 6.

Phần B được bắt đầu sau khi xem xét số liệu về độ an toàn (qua ngày 5) và được động học huyết tương (qua 24 h) từ Nhóm 3a trong Phần A. Số liệu về độ an toàn khả dụng (qua ngày 5) và số liệu dược động học (qua 24 h) được xem xét đối với nhóm thứ nhất trong Phần B (Nhóm 1b) trước khi tham gia vào các nhóm Phần B tiếp theo. Các nhóm Phần B tiếp theo chỉ được định liều sau khi xem xét số liệu về độ an toàn khả dụng và số liệu dược động học từ các liều tương ứng trong Phần A cũng như độ an toàn khả dụng (qua ngày 5) từ các nhóm Phần B trước.

Việc tăng dần liều lên đến 600 mg ở bệnh nhân bị nhiễm HCV được tiến hành sau khi xem xét thỏa đáng số liệu này. Chế độ liều đối với phần B được thể hiện trong Bảng 33.

Bảng 33. Chế độ liều đối với Hợp chất 2 trong Phần B của nghiên cứu

Nhóm	Quần thể	N (hoạt tính)	Hợp chất 2 (Hợp chất 1)*
1b	Nhiễm GT1 HCV	3	100 (90) mg x 1 ngày
2b	Nhiễm GT1 HCV	3	300 (270) mg x 1 ngày
3b	Nhiễm GT1 HCV	3	400 (360) mg x 1 ngày
4b	Nhiễm GT1 HCV	3	600 (540) mg x 1 ngày

*Liều lâm sàng được biểu diễn theo Hợp chất 2, với đương lượng bazơ Hợp chất 1 xấp xỉ trong ngoặc.

Bệnh nhân bị nhiễm HCV là đối tượng bị nhiễm GT1 không xơ gan, chưa điều trị, với tải lượng virut $\geq 5 \log_{10}$ IU/mL.

Không có sự kiện bất lợi nghiêm trọng nào được ghi nhận và không cần đến sự ngừng sớm nào trong Phần A hoặc Phần B. Tất cả các tác dụng bất lợi đều có cường độ từ nhẹ đến vừa phải và không có mô hình liên quan đến liều nào là rõ ràng, bao gồm các thông số phòng thí nghiệm, dấu hiệu sống, và ECG.

Ví dụ 24. Kết quả nghiên cứu về liều đơn tăng dần (SAD) của Hợp chất 2

Dược động học của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa dạng nucleosit 1-7 được đo sau liều đơn của Hợp chất 2. Nồng độ cực tiểu trong huyết tương C_{24s} (C_{24h}) của chất chuyển hóa 1-7 ở bệnh nhân bị nhiễm HCV sau một liều 600 mg của Hợp chất 2 là 25.8 ng/mL, lớn hơn so với hai lần nồng độ trong huyết tương liều sau một liều 300 mg của Hợp chất 2. Chất chuyển hóa 1-7 (được thể hiện trong Sơ đồ 1) chỉ có thể được tạo ra qua sự khử phosphoryl hóa phosphat nội bào chất chuyển hóa 1-4, chất chuyển hóa 1-5, và chất chuyển hóa 1-6, là loại hoạt tính. Do đó, chất chuyển hóa 1-7 có thể được coi là đại diện cho loại hoạt tính. Số liệu dược động học đối với tất cả các nhóm được thể hiện trong bảng 34 và bảng 35. Các giá trị được thông báo dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD, ngoại trừ T_{max} trong đó trung vị (giới hạn) được thông báo. Các thông số dược động học là tương đương ở người khỏe mạnh và bệnh nhân nhiễm HCV.

Bảng 34. Dược động học ở người của Hợp chất 1 và Chất chuyển hóa 1-7 sau khi dùng liều đơn của Hợp chất 2 ở người tự nguyện khỏe mạnh

	Liều (mg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tot} (ng*h/mL)	T _{1/2} (h)	C _{24h} (ng/mL)
Phần A, đối tượng khỏe mạnh						
Hợp chất 1	50	46,4 $\pm$ 17,6	0,5 (0,5-0,5)	36,4 $\pm$ 12,3	0,32 $\pm$ 0,02	--
	100	156 $\pm$ 96,3	0,5 (0,5-1,0)	167 $\pm$ 110	0,53 $\pm$ 0,24	--

	200	818 ± 443	0,5 (0,5-3,0)	656 ± 255	0,71 ± 0,16	--
	400	1194 ± 401	0,5 (0,5-1,0)	1108 ± 326	0,86 ± 0,15	--
Chất chuyển hóa 1-7	50	27,9 ± 5,62	3,5 (3,0-4,0)	285 ± 69,4	7,07 ± 4,59	2,28 ± 0,95
	100	56,6 ± 14,0	4,0 (3,0-6,0)	663 ± 242	17,7 ± 14,7	4,45 ± 1,87
	200	111 ± 38,8	5,0 (3,0-6,0)	1524 ± 497	15,9 ± 7,95	13,7 ± 5,09
	400	153 ± 49,4	6,0 (4,0-8,0)	2342 ± 598	15,6 ± 6,37	23,5 ± 6,31

*Dựa trên profin 24-hr.

Bảng 35. Dược động học ở người của Hợp chất 1 và Chất chuyển hóa 1-7 sau khi dùng Hợp chất 2 ở bệnh nhân bị nhiễm GT1-HCV

	Liều (mg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{tot} (ng*h/mL)	T_{1/2} (h)	C_{24h} (ng/mL)
Hợp chất 1	100	212 ± 32,0	0,5 (0,5-1,0)	179 ± 54,4	0,54 ± 0,12	--
	300	871 ± 590	0,5 (0,5-1,0)	818 ± 475	0,64 ± 0,20	--
	300	2277 ± 893	0,5 (0,5-1,0)	1856 ± 1025	0,84 ± 0,18	--
	400	2675 ± 2114	1,0 (1,0-2,0)	2408 ± 1013	0,86 ± 0,18	--
	600	3543 ± 1649	1,0 (0,5-1,0)	4132 ± 1127	0,70 ± 0,13	--
Chất chuyển hóa 1-7	100	50,2 ± 15,4	6,0 (4,0-6,0)	538 ± 103*	8,4 ± 4,3*	3,60 ± 0,40
	300	96,9 ± 38,9	6,0 (3,0-6,0)	1131 ± 273*	8,1 ± 2,4*	10,9 ± 3,51
	300	123 ± 16,6	4,0 (3,0-6,0)	1420 ± 221	--	18,0 ± 8,83

	400	160 ± 36,7	4,0 (4,0-4,0)	2132 ± 120	11,6 ± 1,21	22,5 ± 3,29
	600	198 ± 19,3	4,0 (4,0-6,0)	2176 ± 116	--	25,8 ± 4,08

*Dựa trên profin 24-hr.

Profin nồng độ trong huyết tương trung bình-thời gian của Hợp chất 1 và chất chuyển hóa 1-7 là cũng được tính đối với tất cả các nhóm của Phần A và Phần B của nghiên cứu. FIG. 21 là nồng độ trong huyết tương trung bình của Hợp chất 1 sau liều đơn của Hợp chất 2 và FIG. 22 là nồng độ trong huyết tương trung bình của chất chuyển hóa 1-7 sau liều đơn của Hợp chất 2. Như được thể hiện trên FIG. 21, Hợp chất 1 được hấp thu nhanh và được chuyển hóa nhanh/rộng trong tất cả các nhóm từ Phần B. Như được thể hiện trên FIG. 22, chất chuyển hóa 1-7 là chất chuyển hóa chính và có nồng độ trong huyết tương ổn định. Mức biểu hiện trong huyết tương của Hợp chất 1 liên quan đến liều và mức biểu hiện của chất chuyển hóa 1-7 là tỷ lệ với liều.

Đối với các đối tượng bị nhiễm HCV của Phần B, các phép đo định lượng ARN của HCV được thực hiện trước, trong khi, và sau khi dùng Hợp chất 2. Việc xác định ARN của HCV trong huyết tương được thực hiện nhờ sử dụng thử nghiệm thương mại có hiệu lực. Giá trị cơ sở được xác định là giá trị trung bình của ngày -1 và ngày 1 (trước định liều). Liều duy nhất 300 mg của Hợp chất 2 (tương đương với 270 mg của Hợp chất 1) tạo ra hoạt tính kháng virus đáng kể ở đối tượng bị nhiễm HCV GT1b. Mức giảm ARN của HCV cực đại trung bình 24 giờ sau định liều sau liều duy nhất 300 mg là 1,7 log₁₀ IU/mL và mức này tương đương với mức giảm -2 log₁₀ IU/mL sau 1 ngày dùng liệu pháp duy nhất 400 mg sofosbuvir ở đối tượng bị nhiễm HCV GT1a. Mức giảm ARN của HCV cực đại trung bình 24 giờ sau định liều sau liều đơn 100 mg là 0,8 log₁₀ IU/mL. Mức giảm ARN của HCV cực đại trung bình là 2,2 log₁₀ IU/mL sau liều đơn 400 mg. Phân tích dược động học/dược lực học riêng rẽ đối với các đối tượng riêng rẽ từ Phần B của nghiên cứu được thể hiện trên FIG. 23A-23F. Nồng độ chất chuyển hóa 1-7 được vẽ theo Nồng độ giảm ARN của HCV, và như được thể hiện trên FIG. 23A-23F, mức giảm ARN của HCV trong huyết tương tương quan với mức biểu hiện chất chuyển hóa 1-7 huyết tương. Đáp ứng virus là phù hợp với chất chuyển hóa 1-7 nồng độ trong huyết tương cao hơn so với giá trị EC₉₅ kháng GT1b. Tương quan giữa nồng độ trong huyết

tương và Mức giảm ARN của HCV chỉ ra rằng đáp ứng sâu sắc hơn có thể đạt được với các liều cao hơn của Hợp chất 2.

Ví dụ 25. Mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán của chất chuyển hóa 1-7 vượt quá giá trị EC₉₅ của Hợp chất 1 kháng các thể phân lập lâm sàng của HCV GT 1-4

Như được thể hiện trên FIG. 24, mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định (C_{24,ss}) của chất chuyển hóa 1-7 sau định liều Hợp chất 2 ở người (600 mg QD (550 mg đương lượng bazơ tự do) và 450 mg QD (400 mg đương lượng bazơ tự do)) được dự đoán và so với EC₉₅ của Hợp chất 1 *in vitro* đối với tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm để xác định xem nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định có luôn cao hơn EC₉₅ hay không, có thể dẫn đến hiệu quả cao kháng bất kỳ hoặc tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm *in vivo*. EC₉₅ đối với Hợp chất 1 là giống như EC₉₅ của Hợp chất 2. Đối với Hợp chất 2 có hiệu quả, mức cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định của chất chuyển hóa 1-7 cần vượt quá EC₉₅.

Như được thể hiện trên FIG. 24, EC₉₅ của Hợp chất 2 kháng tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm nằm trong khoảng từ 18 đến 24 nM.

Như được thể hiện trên FIG. 24, Hợp chất 2 ở liều 450 mg QD (400 mg đương lượng bazơ tự do) ở người tạo ra nồng độ cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán (C_{24,ss}) khoảng 40 ng/mL. Hợp chất 2 ở liều 600 mg QD (550 mg đương lượng bazơ tự do) ở người tạo ra nồng độ cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán (C_{24,ss}) khoảng 50ng/mL.

Do đó, nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán của chất chuyển hóa đại diện 1-7 là hầu như gấp đôi EC₉₅ kháng tất cả các thể phân lập lâm sàng được thử nghiệm (ngay cả dạng khó điều trị GT3a), chỉ ra hiệu năng vượt trội.

Ngược lại, EC₉₅ của chuẩn nucleotit chữa trị sofosbuvir nằm trong khoảng từ 50 đến 265 nM đối với tất cả các thể phân lập lâm sàng HCV được thử nghiệm, với EC₉₅ nhỏ hơn nồng độ ở trạng thái ổn định dự đoán ở liều thương mại 400 mg đối với chỉ hai thể phân lập, GT2a và GT2b. EC₉₅ đối với liều thương mại 400 mg sofosbuvir là cao hơn nồng độ ở trạng thái ổn định dự đoán đối với các thể phân lập lâm sàng khác, GT1a, GT1b, GT3a, GT4a, và GT4d.

Nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) của Hợp chất 2 ở liều 450 mg được dự đoán bằng cách sử dụng nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) ở liều 300 mg. Nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) trung bình ở liều 300 mg là 26,4 ng/mL, và do đó tính được là $26,4 \times 450 / 300 = 39,6$ ng/mL.

Nồng độ cực tiểu trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) ở liều 600 mg được dự đoán bằng cách sử dụng 3 phương án: 1) 600 mg ngày 1 C_{24} trung bình là 25,8 ng/mL và 60% tăng được giả định để đạt được trạng thái ổn định. Do đó tính được là $25,8 \times 1,6 = 41,3$ ng/mL; 2) 400 mg ngày 1 C_{24} trung bình là 22,5 ng/mL và 60% tăng được giả định để đạt được trạng thái ổn định. Xét đến PK tỷ lệ với liều, tính được là $22,5 \times 1,6 \times 600 / 400 = 54$ ng/mL; và 3) nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) ở liều 300 mg là 26,4 ng/mL và PK tỷ lệ được giả định. Do đó, tính được là $26,4 \times 2 = 52,8$ ng/mL. Nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định ($C_{24,ss}$) ở liều 600 mg là giá trị trung bình của 3 điểm dữ liệu ($(41,3 + 54 + 52,8) / 3 = 49,3$ ng/mL). Thường khoảng 60% tăng về C_{24} ở trạng thái ổn định so với C_{24} sau liều đơn.

Số liệu so sánh hiệu quả và các thông số trạng thái ổn định được động học trên FIG. 24 chứng tỏ tầm quan trọng điều trị bất ngờ của Hợp chất 2 để điều trị viêm gan C. Thực tế, mức trong huyết tương ở trạng thái ổn định dự đoán sau khi dùng Hợp chất 2 được dự đoán là cao hơn ít nhất 2 lần so với EC_{95} đối với tất cả các kiểu gen được thử nghiệm, và hiệu nghiệm kháng GT2 cao hơn từ 3 đến 5 lần. Số liệu này chỉ ra rằng Hợp chất 2 có hoạt tính kháng virus toàn kiểu gen hiệu nghiệm ở người. Như được thể hiện trên FIG. 24, EC_{95} của sofosbuvir ở GT1, GT3, và GT4 là cao hơn 100 ng/mL. Do đó ngạc nhiên là, Hợp chất 2 có hoạt tính kháng HCV ở dạng liều mà phân phối nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định (40-50 ng/mL) thấp hơn so với nồng độ cực tiểu ở trạng thái ổn định (khoảng 100 ng/mL) đạt được bằng dạng liều tương tự của sofosbuvir.

Ví dụ 26. Mô tả công thức và sản xuất Hợp chất 2

Công thức mề đại diện không giới hạn đối với các viên nén chứa Hợp chất 2 (50 mg và 100 mg) được trình bày trong bảng 36. Viên nén được tạo ra từ hỗn hợp chung bằng cách sử dụng quy trình nén trực tiếp như được thể hiện trên FIG. 25. Hoạt chất được (API) được điều chỉnh trên cơ sở thử nghiệm hiện có, với việc điều chỉnh được thực hiện với sự có mặt của xenluloza vi tinh thể. API và tá dược (xenluloza vi tinh thể, lactoza monohydrat, và croscarmelloza natri) được sàng, được đặt vào máy trộn chữ V (PK

Blendmaster, bát 0,5L) và được trộn trong 5 phút ở 25 rpm. Magie stearat tiếp theo được sàng, được bổ sung và hỗn hợp được trộn thêm trong 2 phút. Hỗn hợp chung được chia để sử dụng để tạo viên nén 50 mg và 100 mg. Hỗn hợp đã làm trơn tiếp theo được nén ở tốc độ 10 viên nén/phút bằng cách sử dụng máy nén viên nghiên cứu một khoang dập (Korsch XP1) và bộ cấp liệu bằng trọng lực. Viên nén 50 được tạo ra bằng cách sử dụng dụng cụ lõm chuẩn tròn 6 mm và lực 3,5 kN. Viên nén 100 mg được tạo ra bằng cách sử dụng dụng cụ lõm chuẩn tròn 8 mm và lực 3,9-4,2 kN.

Bảng 36. Công thức của các viên nén 50 mg và 100 mg Hợp chất 2

Nguyên liệu	% w/w	g/mẻ	Mg/đơn vị	
			viên nén 50 mg	viên nén 100 mg
Hợp chất 2	50,0	180,0	50,0	100,0
Xenluloza vi tinh thể, USP/NF, EP	20,0	72,0	20,0	40,0
Lactoza Monohydrat, USP/NF, BP, EP, JP	24,0	86,4	24,0	48,0
Croscarmeloza Natri, USP/NF, EP	5,0	18,0	5,0	10,0
Magie stearat, USP/NF, BP, EP JP	1,0	3,6	1,0	2,0
Tổng			100,0	200,0

Hợp chất 2 được điều chỉnh trên cơ sở thử nghiệm hiện có, với việc điều chỉnh này được thực hiện với sự có mặt của xenluloza vi tinh thể. Hợp chất 2 và tá dược (xenluloza vi tinh thể, lactoza monohydrat, và croscarmeloza natri) được sàng, được đặt vào máy trộn chữ V (PK Blendmaster, bát 0,5L) và được trộn trong 5 phút ở 25 rpm. Magie stearat tiếp theo được sàng, được bổ sung và hỗn hợp được trộn thêm trong 2 phút. Hỗn hợp chung được chia để sử dụng để tạo các viên nén 50 mg và 100 mg. Hỗn hợp đã làm trơn tiếp theo được nén ở tốc độ 10 viên nén/phút bằng cách sử dụng máy nén viên nghiên cứu một khoang dập (Korsch XP1) và bộ cấp liệu bằng trọng lực. Viên nén 50 mg được tạo ra bằng cách sử dụng dụng cụ lõm chuẩn tròn 6 mm và lực 3,5 kN. Viên nén

100 mg được tạo ra bằng cách sử dụng dụng cụ lốm chuẩn tròn 8 mm và lực 3,9-4,2 kN. Đặc điểm kỹ thuật của các viên nén 50 mg và 100 mg được thể hiện trong Bảng 37.

Bảng 37. Đặc điểm kỹ thuật của các viên nén 50 mg và 100 mg Hợp chất 2

	viên nén 50 mg	viên nén 100 mg
Trọng lượng trung bình (n=10)	100 ± 5 mg	200 ± 10 mg
Trọng lượng riêng	100 ± 10 mg	200 ± 20 mg
Độ cứng	5,3 kp	8,3 kp
Thời gian rã	< 15 phút	< 15 phút
Độ bở	NMT 0,5%	NMT 0,5%

Các viên nén 50 mg và 100 mg được tạo ra như được mô tả trên đây trải qua nghiên cứu độ ổn định 6 tháng trong ba điều kiện: 5°C (lạnh), 25°C/60% RH (môi trường), và 40°C/75% RH (tăng tốc). Cả hai viên nén 50 mg và 100 mg đều ổn định hóa học trong cả ba điều kiện được thử nghiệm.

Trong điều kiện lạnh (5 °C), cả hai viên nén 50 mg và 100 mg vẫn giữ trạng thái rắn trắng mà không thay đổi hình dạng bề ngoài từ T=0 đến T=6 tháng. Qua nghiên cứu 6 tháng, không có tạp chất nào được thông báo lớn hơn 0,05% đối với một trong hai viên nén 50 mg hoặc viên nén 100 mg. Hàm lượng nước sau 6 tháng cũng là nhỏ hơn 3,0 % w/w đối với cả hai viên nén. Kết quả tương tự được thông báo khi viên nén được đặt trong điều kiện môi trường (25 °C/60% RH); không có tạp chất nào lớn hơn 0,05% được thông báo qua 6 tháng đối với cả hai viên nén và hàm lượng nước không vượt quá 3,0 % w/w tại thời điểm 6 tháng. Khi viên nén được đặt trong điều kiện tăng tốc (40 °C/75% RH), hình dạng bề ngoài của các viên nén 50 mg và 100 mg không thay đổi từ viên nén tròn, màu trắng. Một tạp chất được thông báo sau 3 tháng, nhưng tạp chất chỉ là 0,09%. Một tạp chất thứ hai được thông báo sau 6 tháng, tổng tỷ lệ phần trăm tạp chất chỉ là 0,21% đối với cả hai viên nén 50 mg và 100 mg. Hàm lượng nước là 3,4 % w/w trong 6 tháng đối với viên nén 50 mg và 3,2 % w/w đối với viên nén 100 mg.

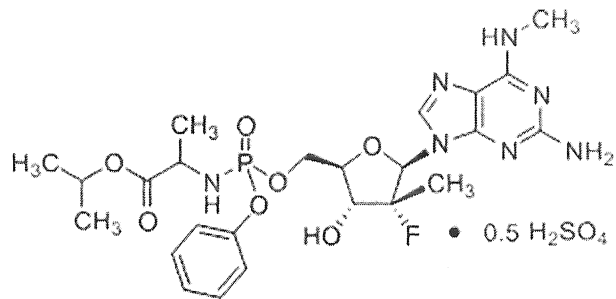
Trong nghiên cứu riêng, độ ổn định của viên nén 50 mg và 100 mg của Hợp chất 2 ở điều kiện môi trường (25 °C/60% RH) được đo trong 9 tháng. Hình dạng bề ngoài của viên nén 50 mg và 100 mg không thay đổi từ viên nén tròn màu trắng trong khoảng

thời gian 9 tháng. Tạp chất trong viên nén 50 mg là nhỏ hơn 0,10% sau 9 tháng và tạp chất trong viên nén 100 mg là nhỏ hơn 0,05%. Hàm lượng nước của viên nén 50 mg và viên nén 100 mg sau 9 tháng lần lượt là chỉ 2,7 % w/w và 2,6 % w/w.

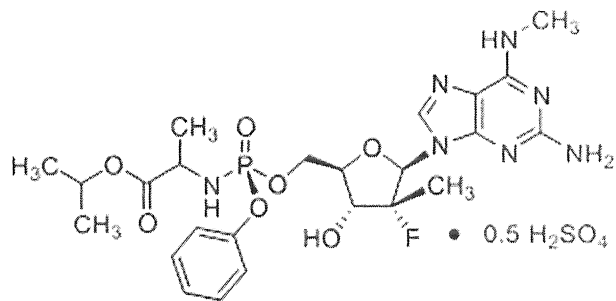
Bản mô tả này được mô tả theo các phương án của sáng chế. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rằng các cải biến và thay đổi có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế như nêu trong yêu cầu bảo hộ dưới đây. Do đó, bản mô tả được coi là minh họa mà không giới hạn, và tất cả các cải biến như vậy được dự tính là nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

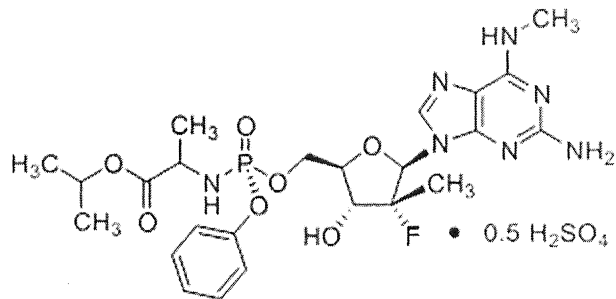
1. Hợp chất có công thức:



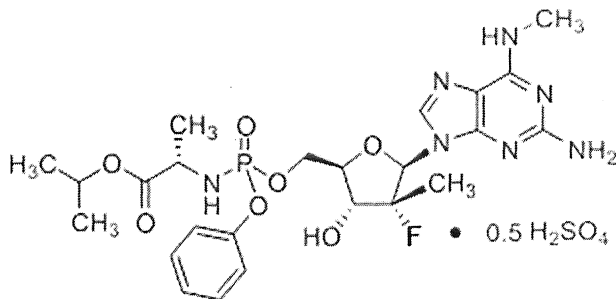
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



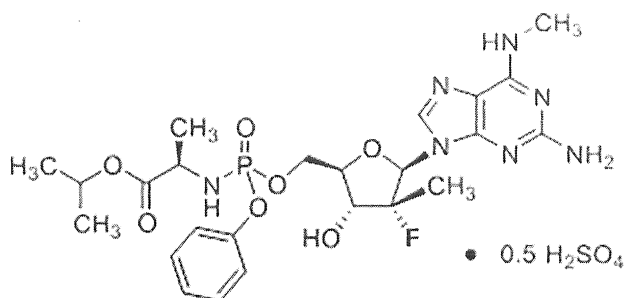
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



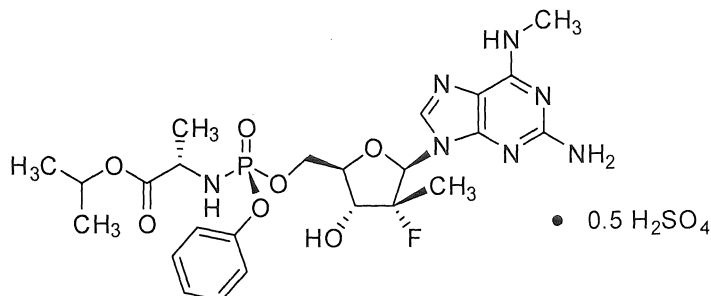
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



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



6. Hợp chất có công thức:

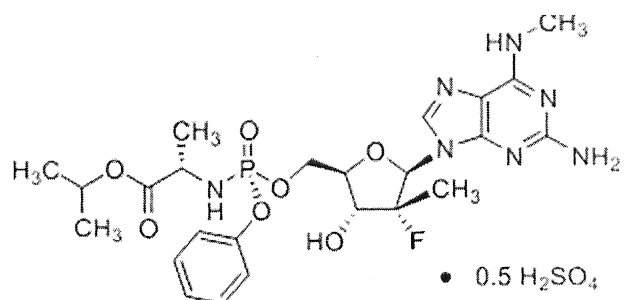


7. Hợp chất theo điểm 6, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 90% không chứa chất đồng phân đối ảnh R đối lập ở nguyên tử phospho.

8. Hợp chất theo điểm 6, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 98% không chứa chất đồng phân đối ảnh R đối lập ở nguyên tử phospho.

9. Hợp chất theo điểm 6, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 99% không chứa chất đồng phân đối ảnh R đối lập ở nguyên tử phospho.

10. Hợp chất có công thức:

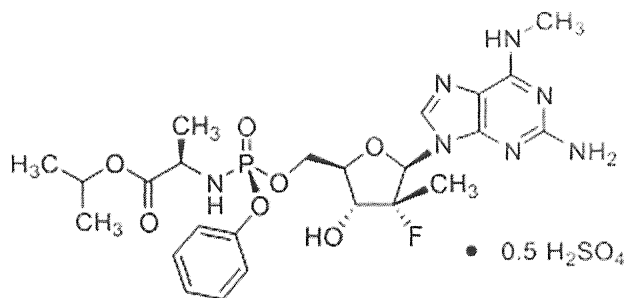


11. Hợp chất theo điểm 10, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 90% không chứa chất đồng phân đối ảnh S đối lập ở nguyên tử phospho.

12. Hợp chất theo điểm 10, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 98% không chứa chất đồng phân đối ảnh S đối lập ở nguyên tử phospho.

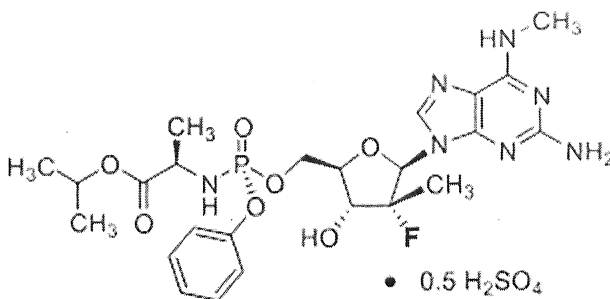
13. Hợp chất theo điểm 10, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 99% không chứa chất đồng phân đối ảnh S đối lập ở nguyên tử phospho.

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



15. Hợp chất theo điểm 14, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 90% không chứa chất đồng phân đối ảnh R đối lập ở nguyên tử phospho.

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



17. Hợp chất theo điểm 16, trong đó hợp chất này ở dạng mà ít nhất 90% không chứa chất đồng phân đối ảnh S đối lập ở nguyên tử phospho.

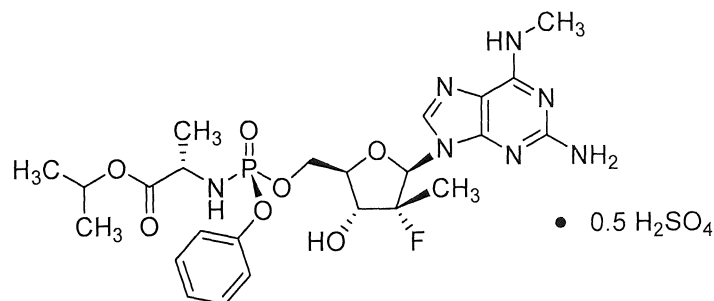
18. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 trong chất mang dược dụng, để dùng trong điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C ở người cần điều trị.

19. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và từ 14 đến 17 trong chất mang dược dụng, để dùng trong điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C ở người cần điều trị.

20. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 6 trong chất mang dược dụng, để dùng trong điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C ở người cần điều trị.

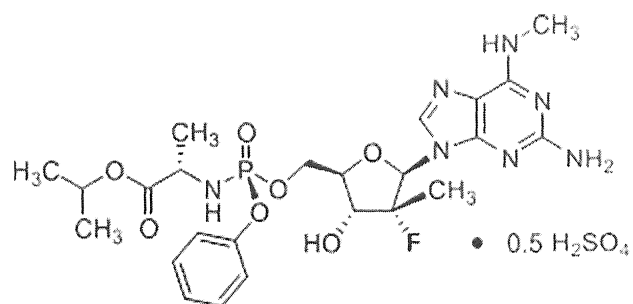
21. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9 trong chất mang dược dụng, để dùng trong điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C ở người cần điều trị.

22. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 10 trong chất mang dược dụng, để dùng trong điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C ở người cần điều trị.
23. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13 trong chất mang dược dụng, để dùng trong điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C ở người cần điều trị.
24. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó hợp chất được dùng qua đường miệng.
25. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó hợp chất được dùng qua đường trong tĩnh mạch.
26. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó hợp chất được dùng ngoài đường tiêu hóa.
27. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó ít nhất 400 mg hợp chất được dùng.
28. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó ít nhất 500 mg hợp chất được dùng.
29. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó ít nhất 600 mg hợp chất được dùng.
30. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó ít nhất 700 mg hợp chất được dùng.
31. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó hợp chất này là chất rắn vô định hình.
32. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó hợp chất này là chất rắn dạng tinh thể.
33. Hợp chất có công thức



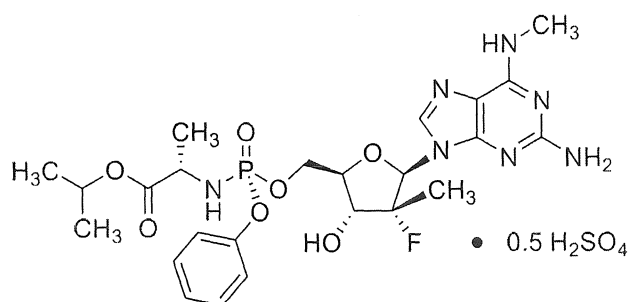
trong đó hợp chất này là chất rắn vô định hình.

34. Hợp chất có công thức:



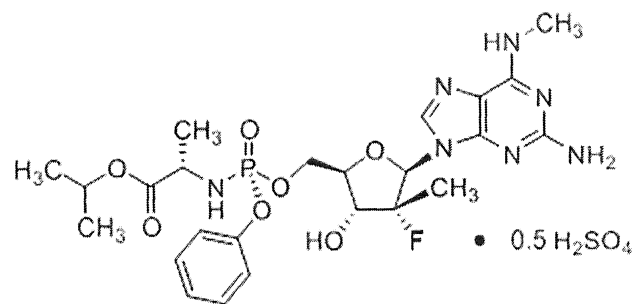
trong đó hợp chất này là chất rắn dạng tinh thể.

35. Hợp chất có công thức:



trong đó hợp chất này là chất rắn vô định hình.

36. Hợp chất có công thức:



trong đó hợp chất này là chất rắn dạng tinh thể.

1/28

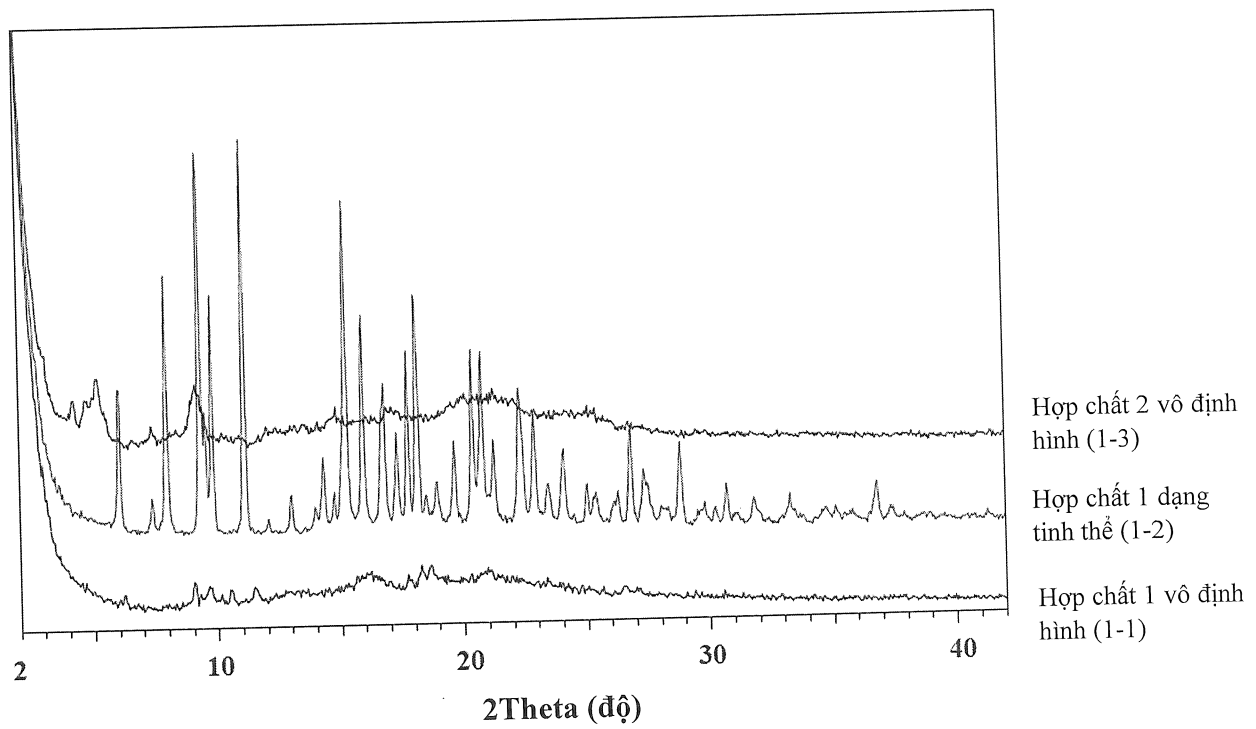


FIG. 1A

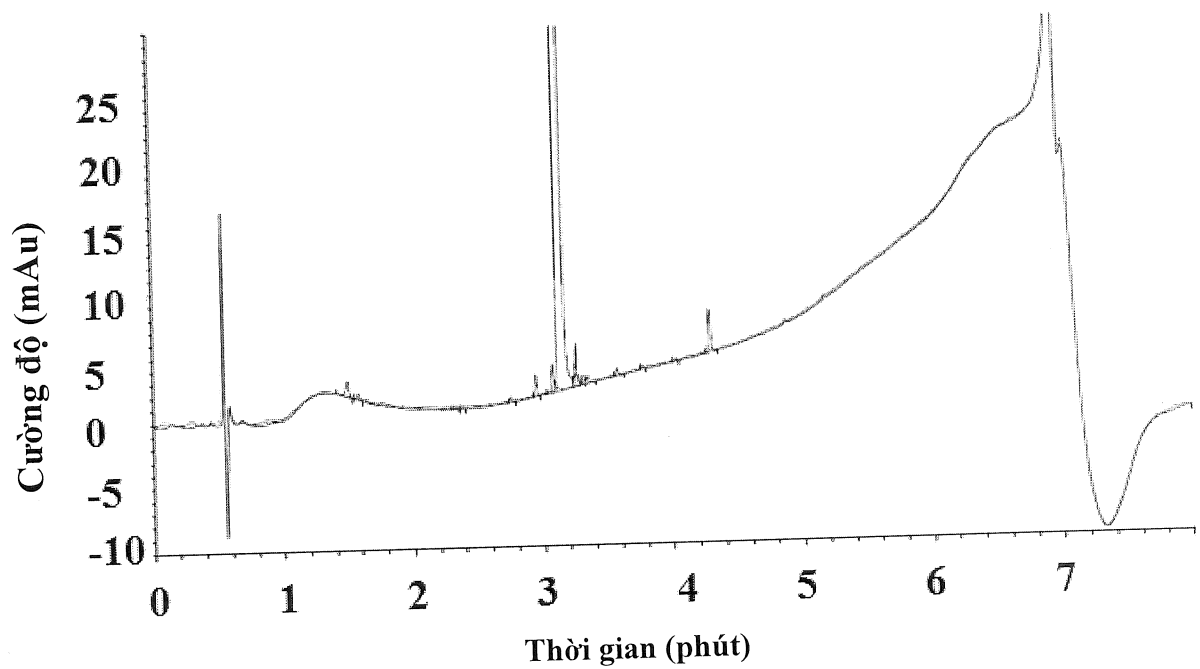


FIG. 1B

2/28

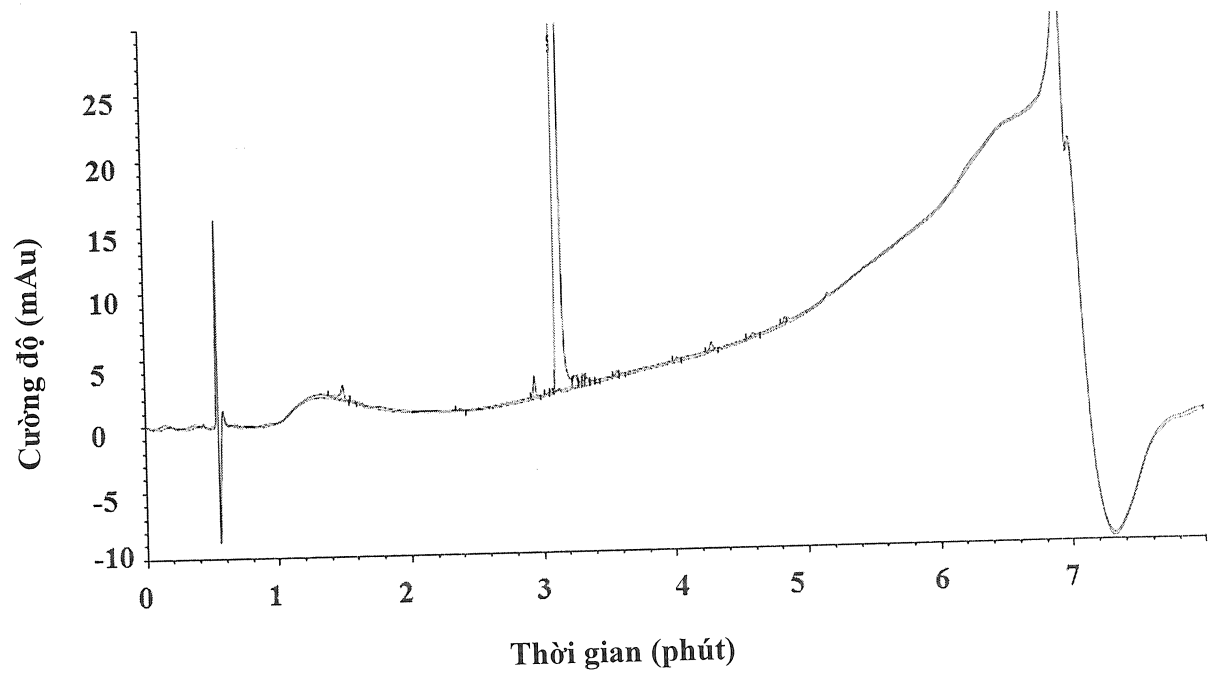


FIG. 2A

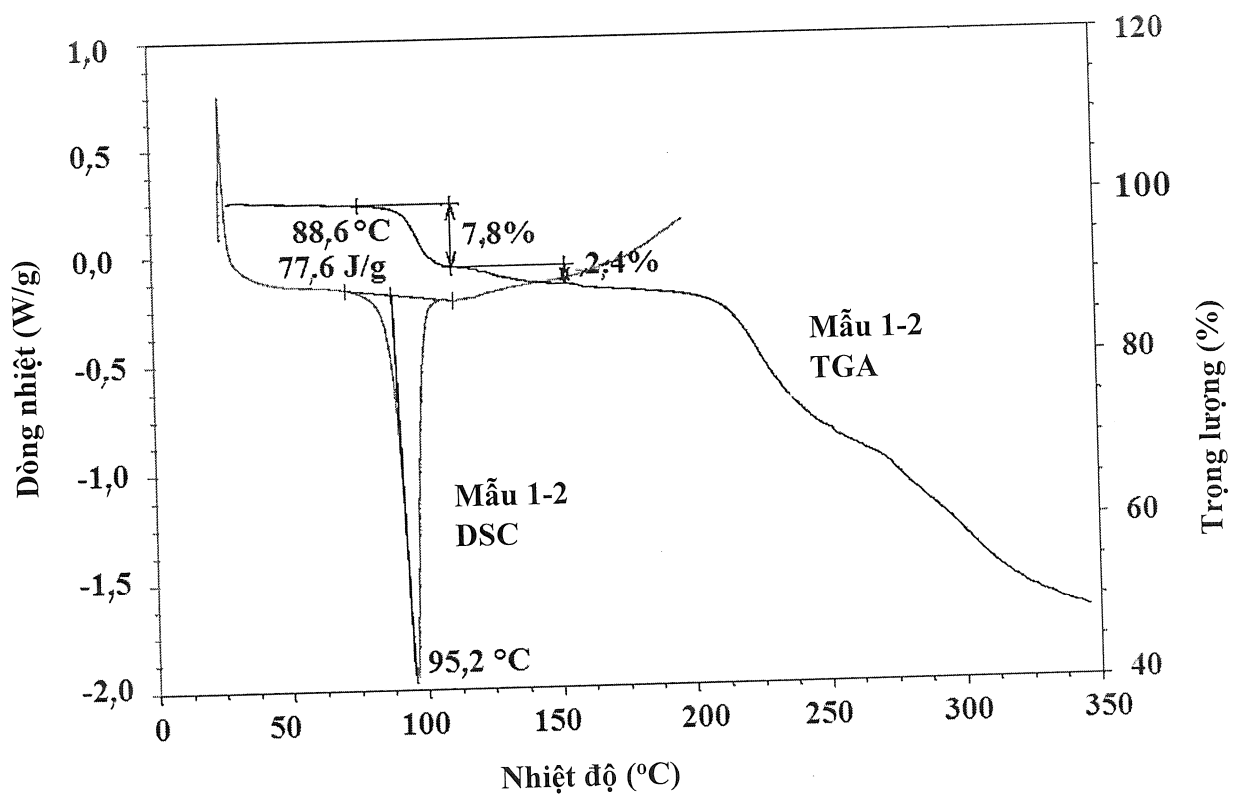


FIG. 2B

3/28

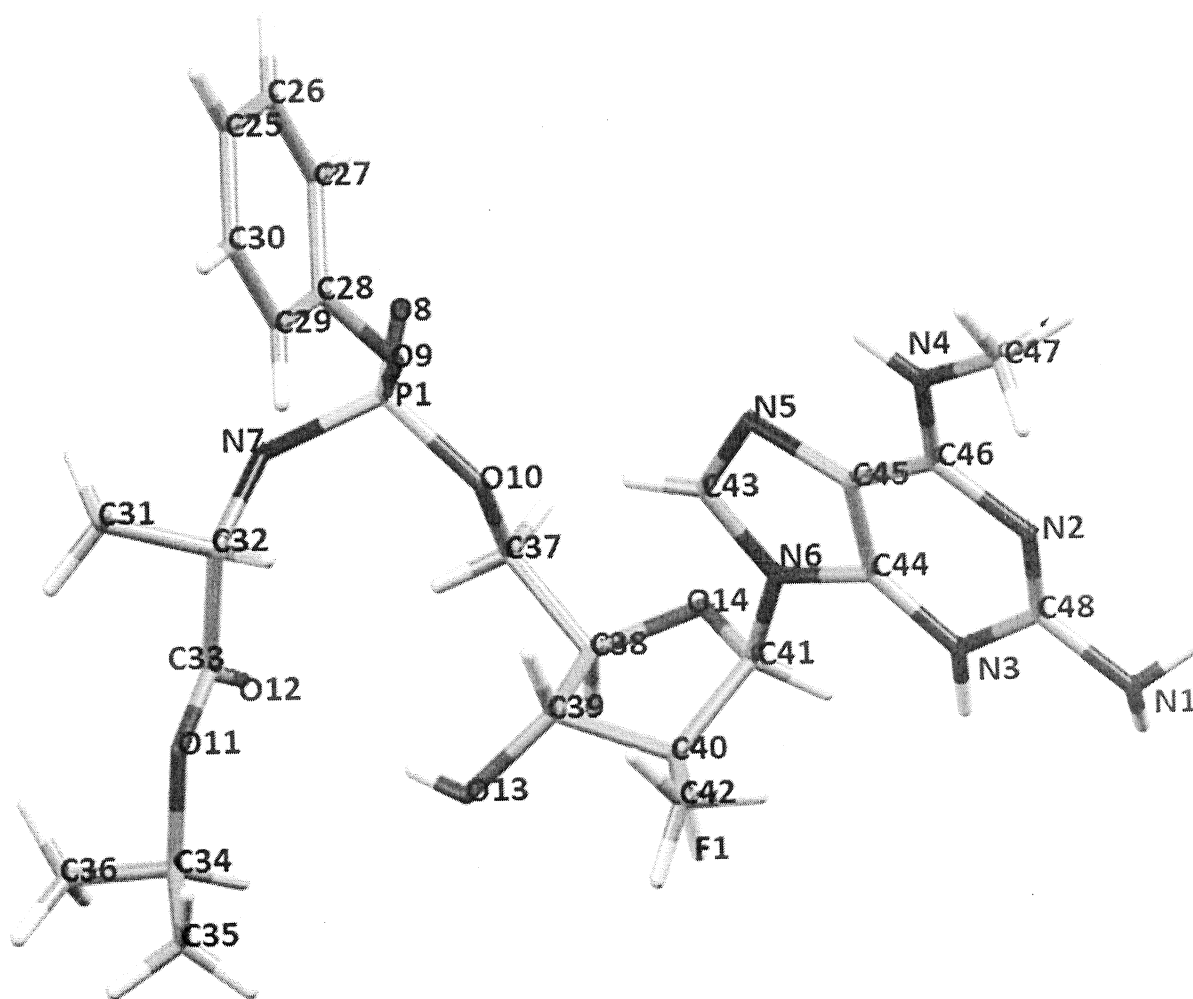


FIG. 3

4/28

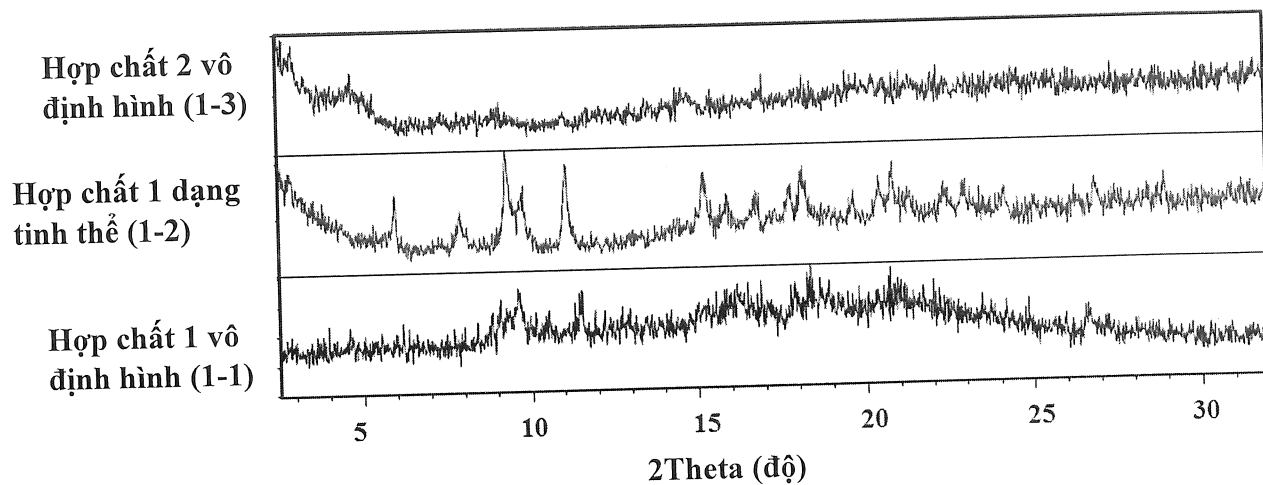


FIG. 4A

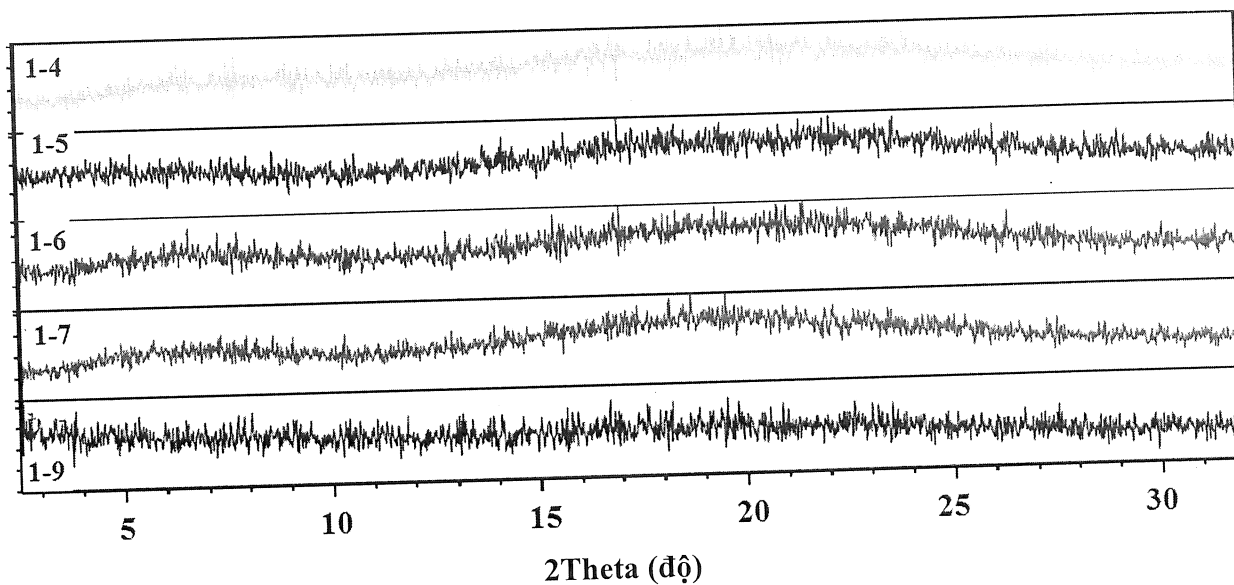


FIG. 4B

5/28

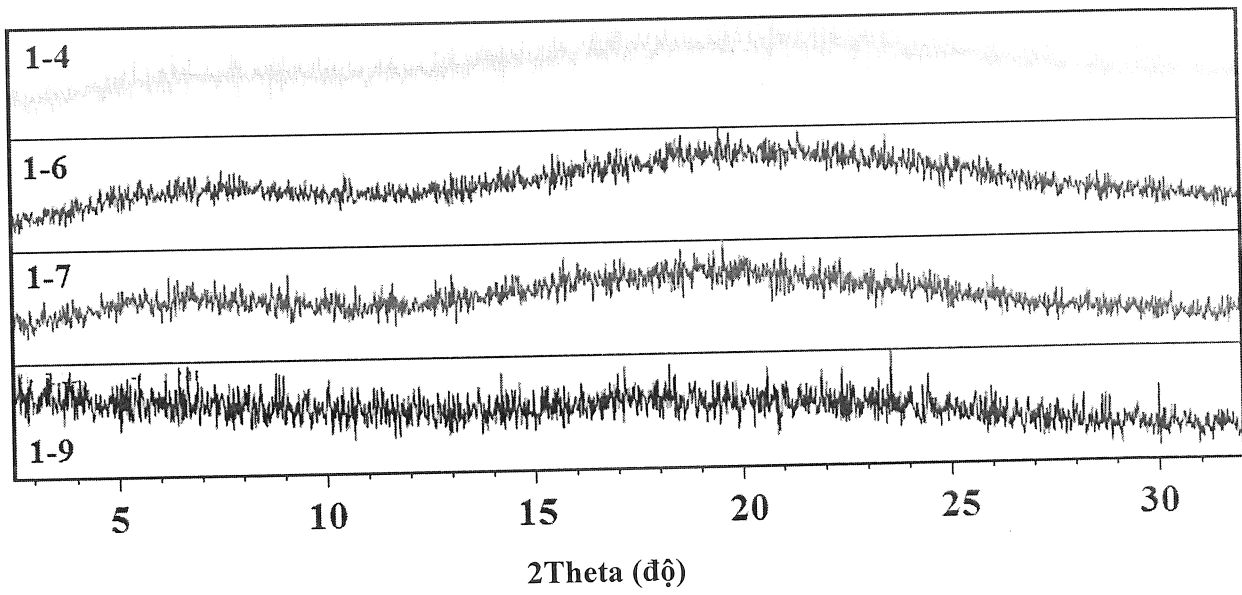


FIG. 5A

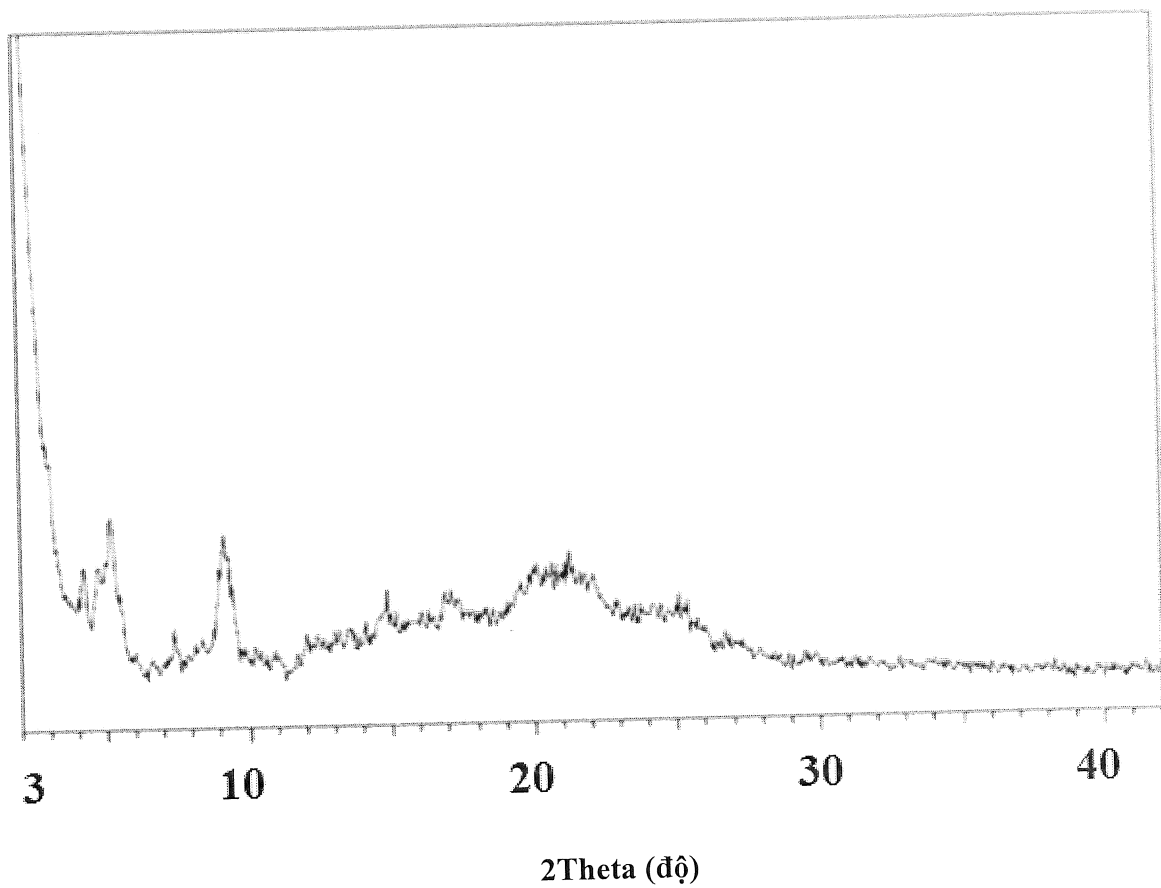


FIG. 5B

6/28

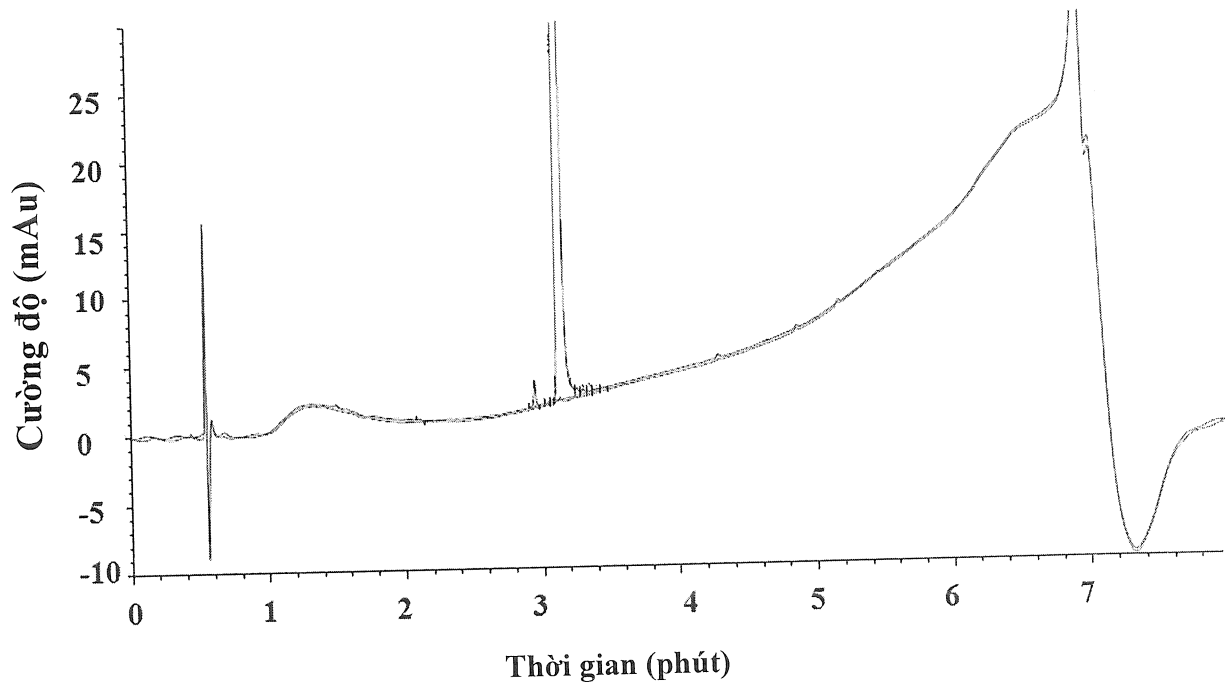


FIG. 6A

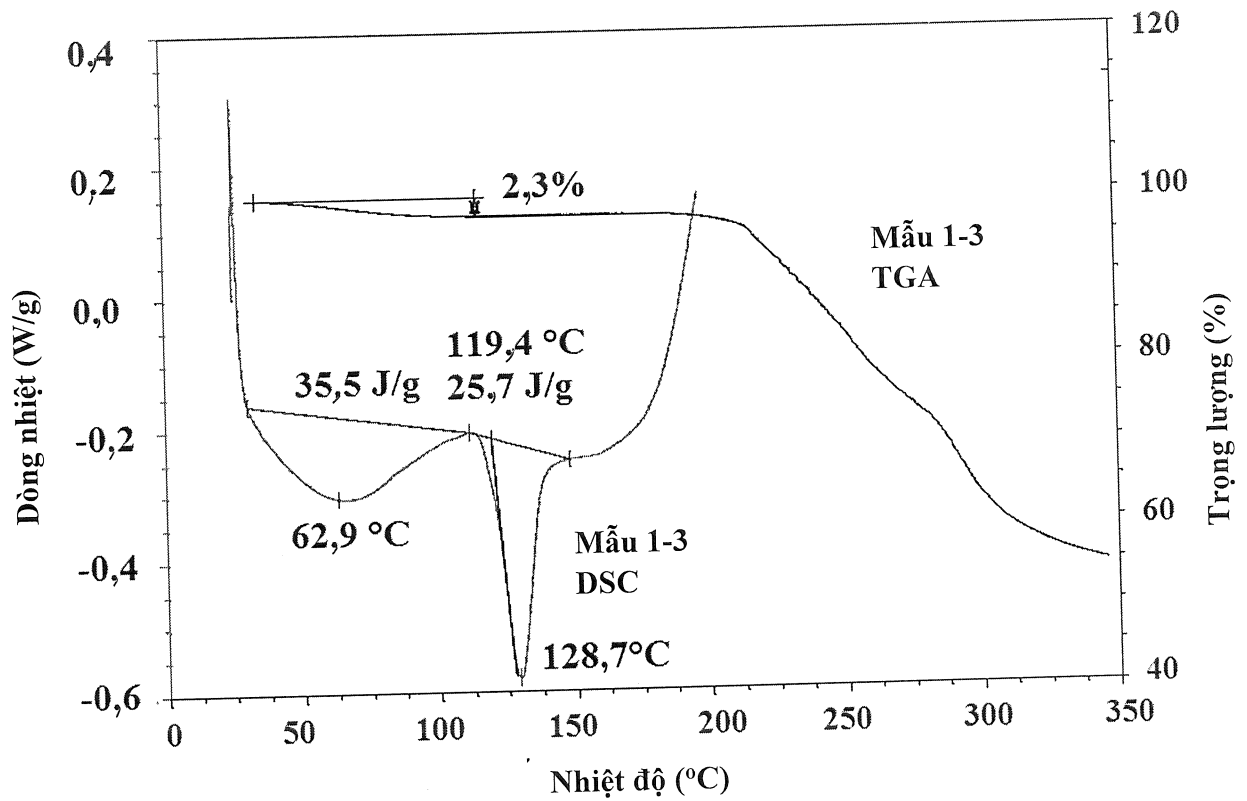


FIG. 6B

7/28

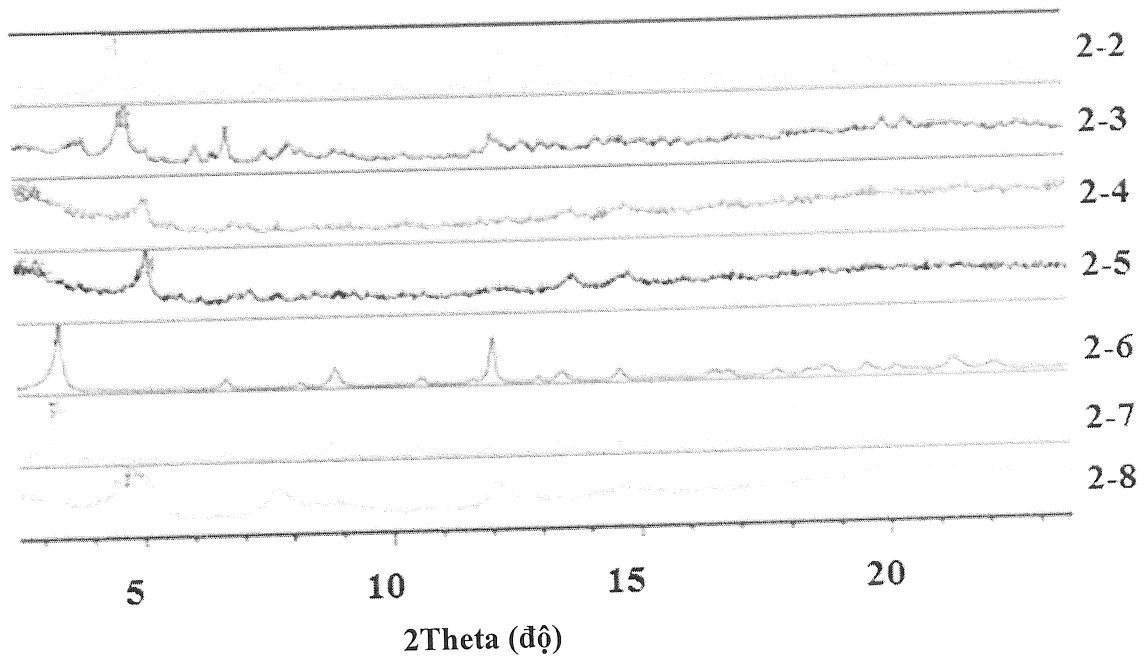


FIG. 7A

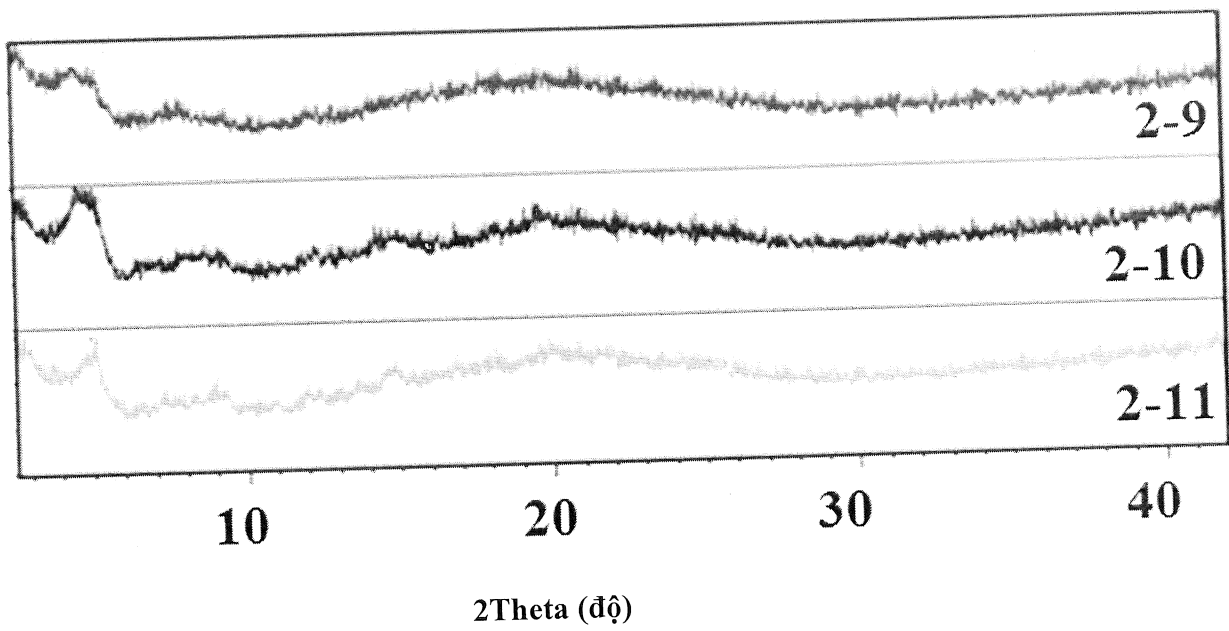


FIG. 7B

8/28

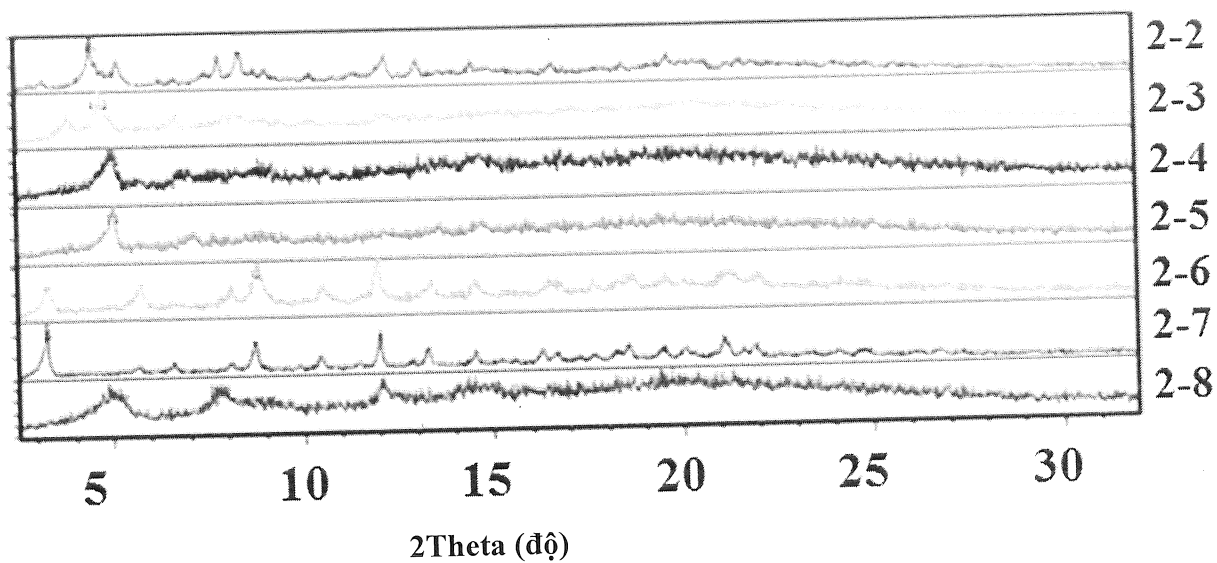


FIG. 8A

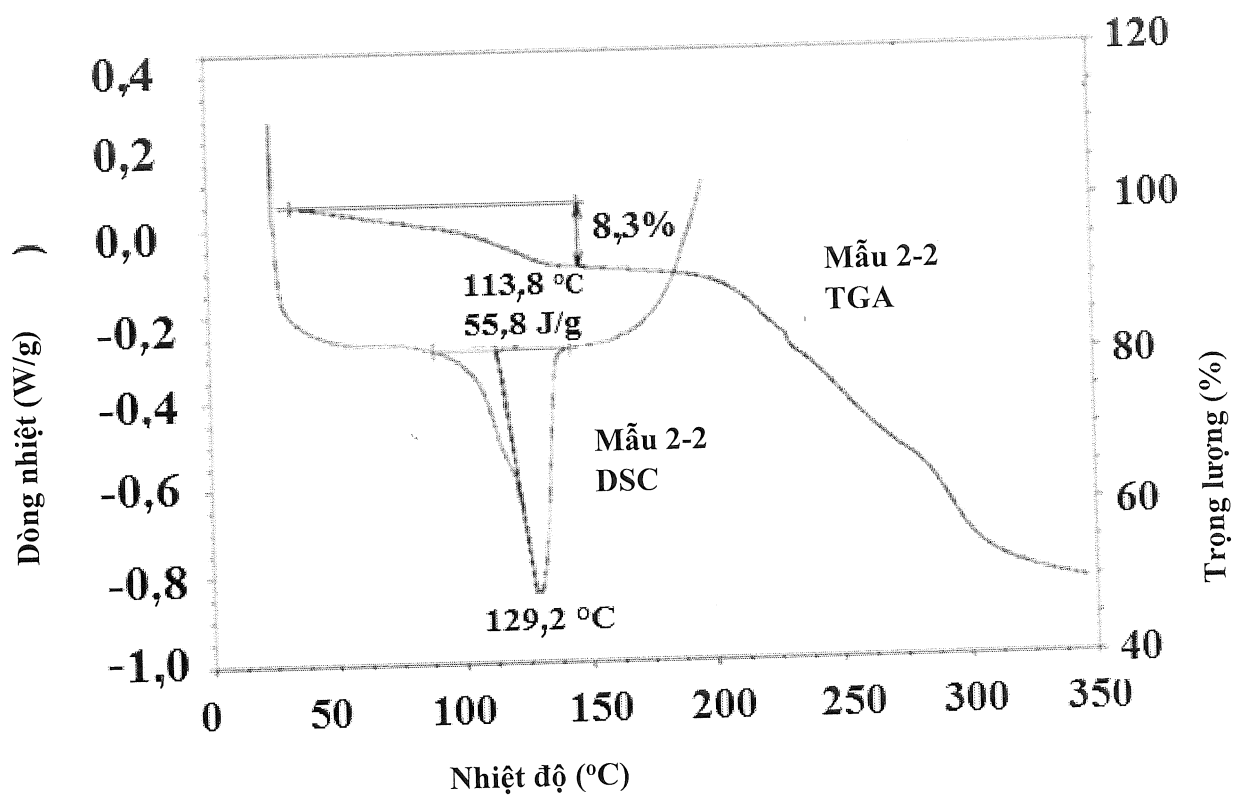


FIG. 8B

9/28

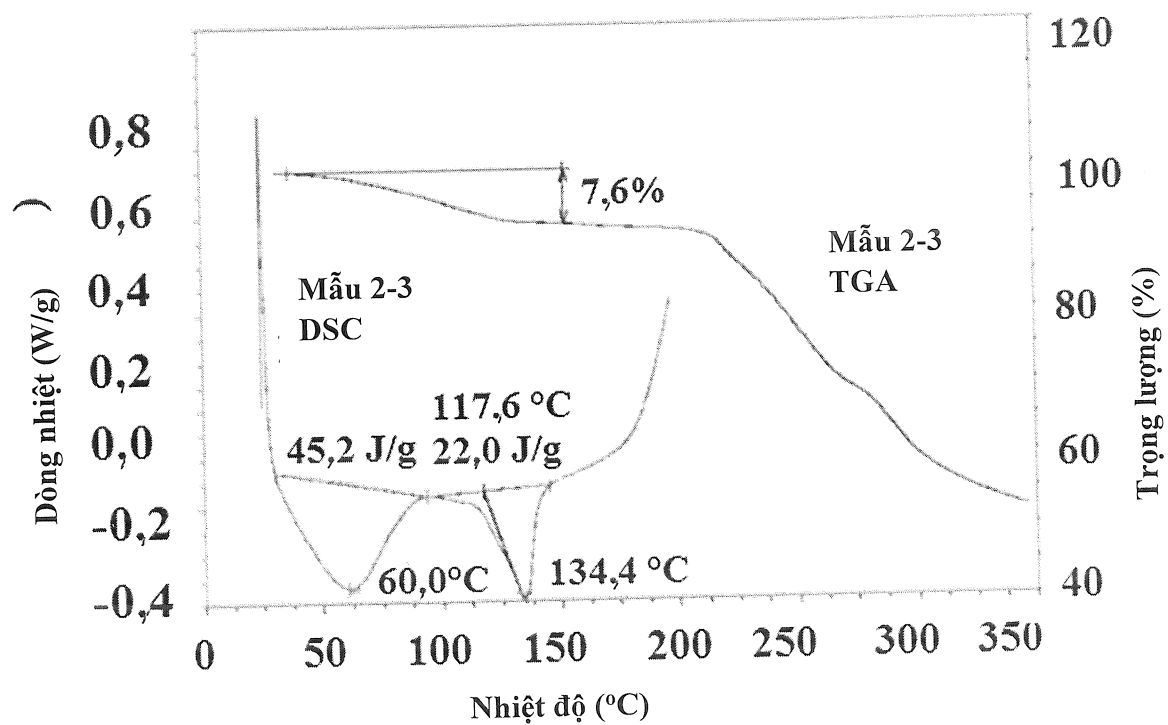


FIG. 9A

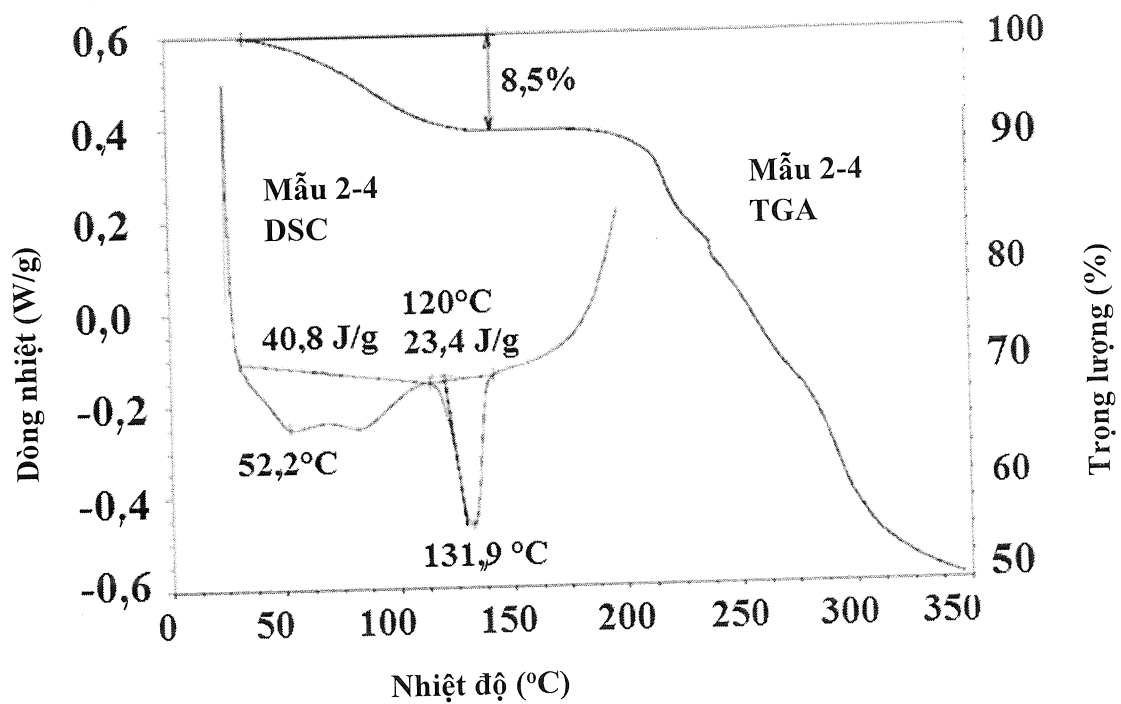


FIG. 9B

10/28

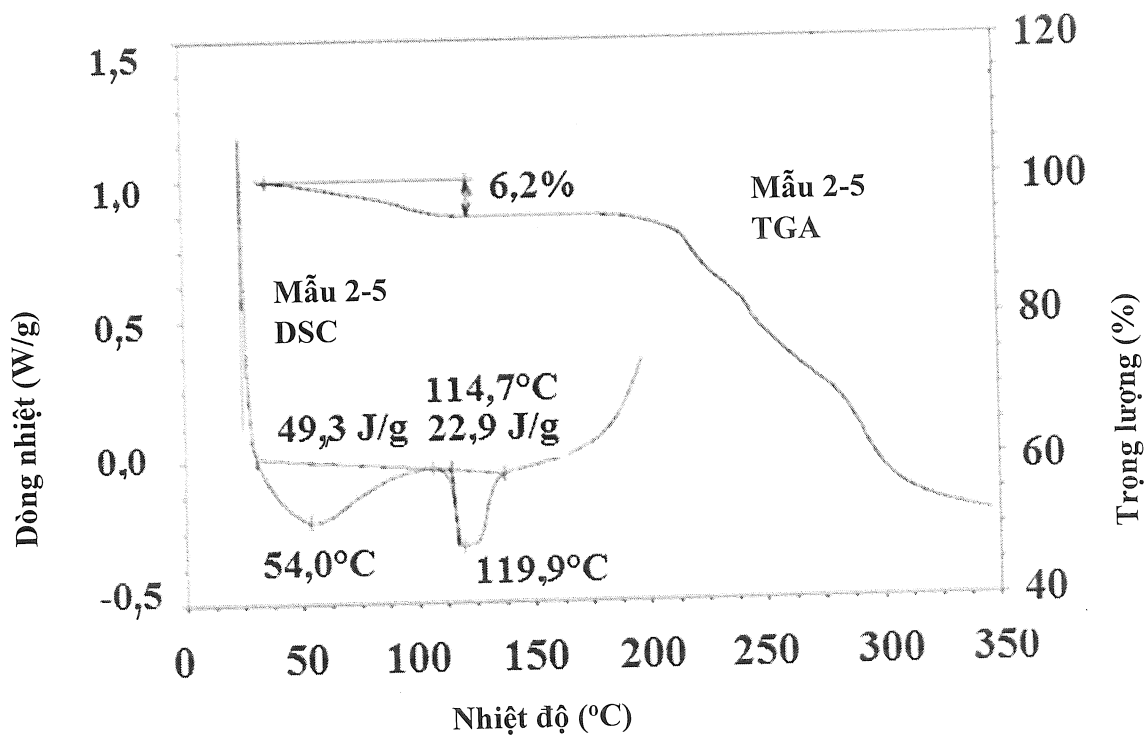


FIG. 10A

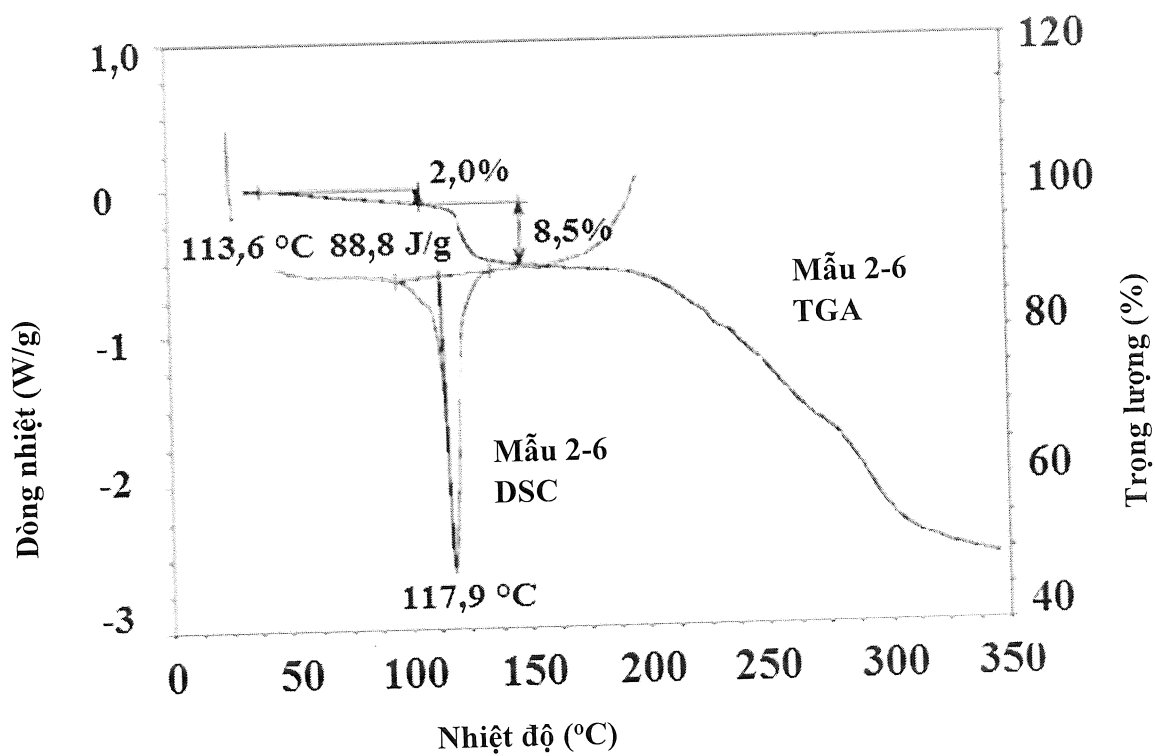


FIG. 10B

11/28

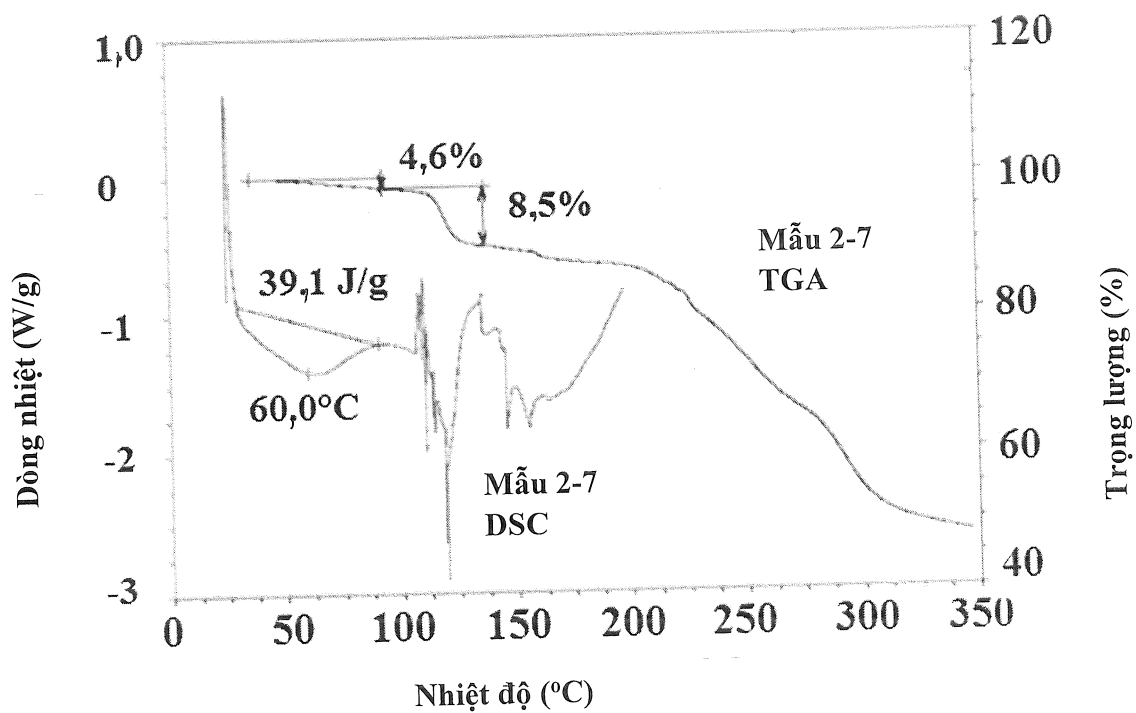


FIG. 11A

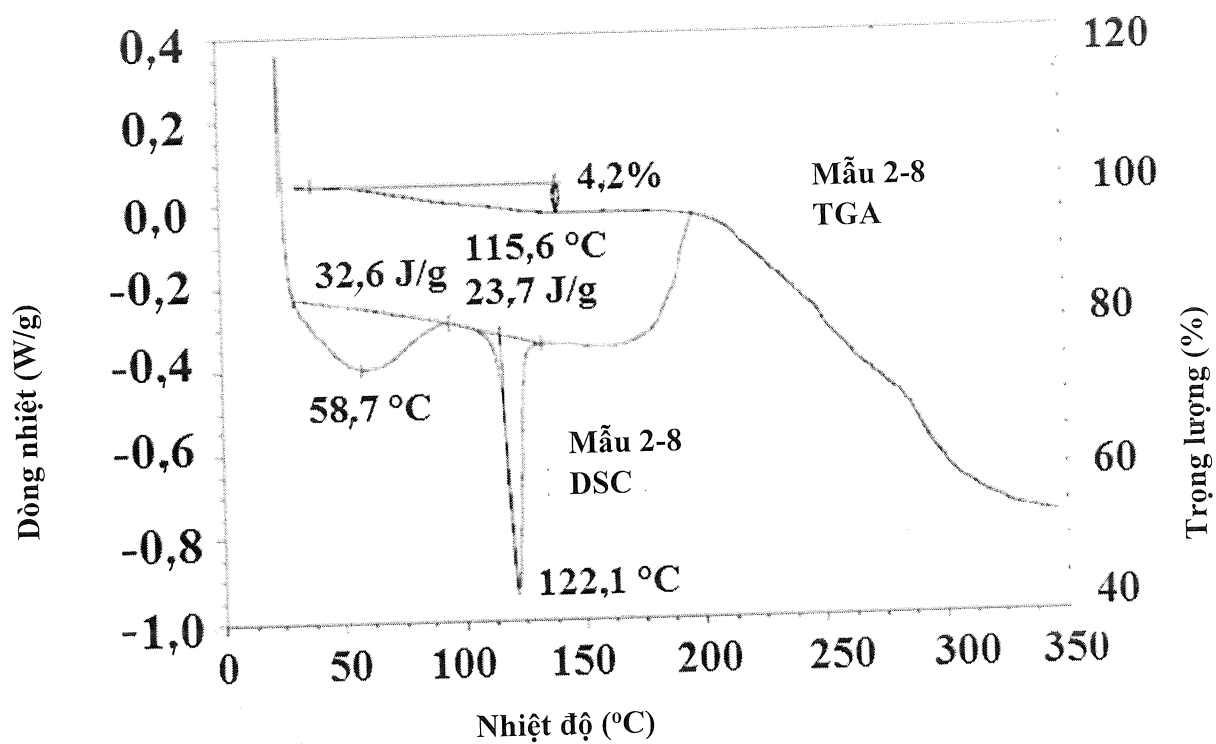


FIG. 11B

12/28

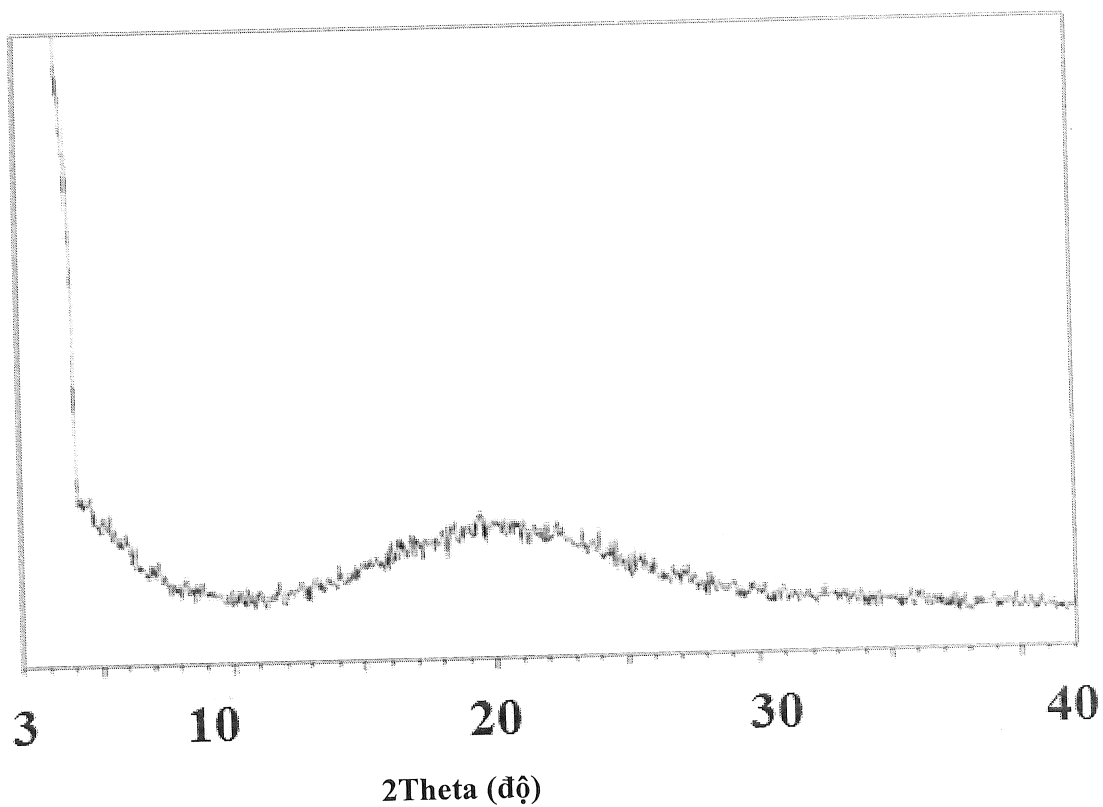


FIG. 12A

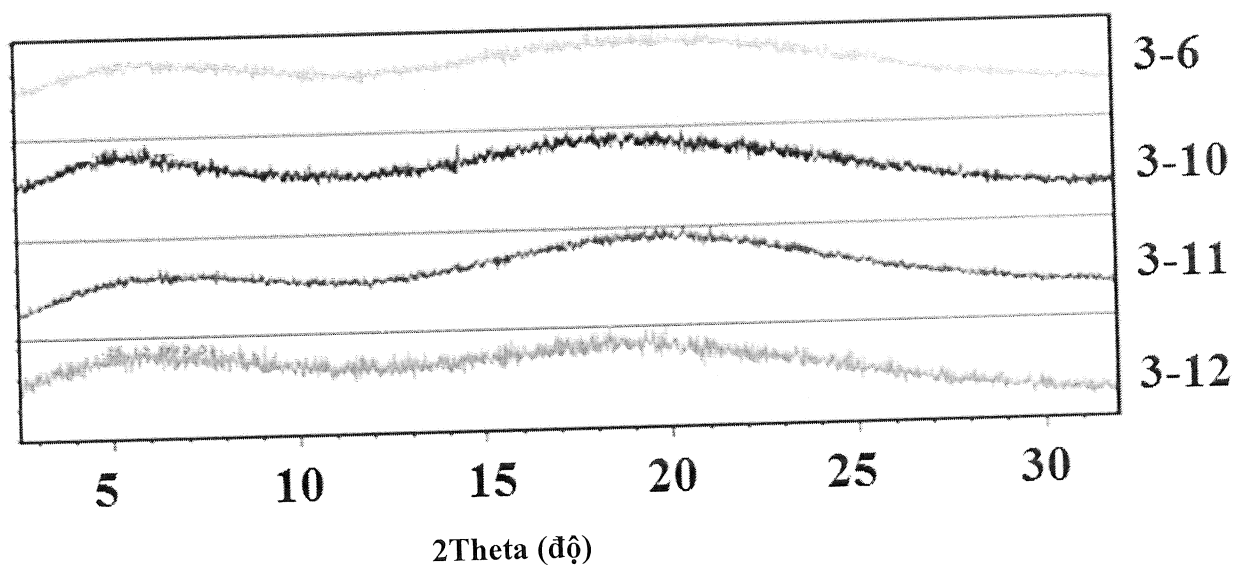


FIG. 12B

13/28

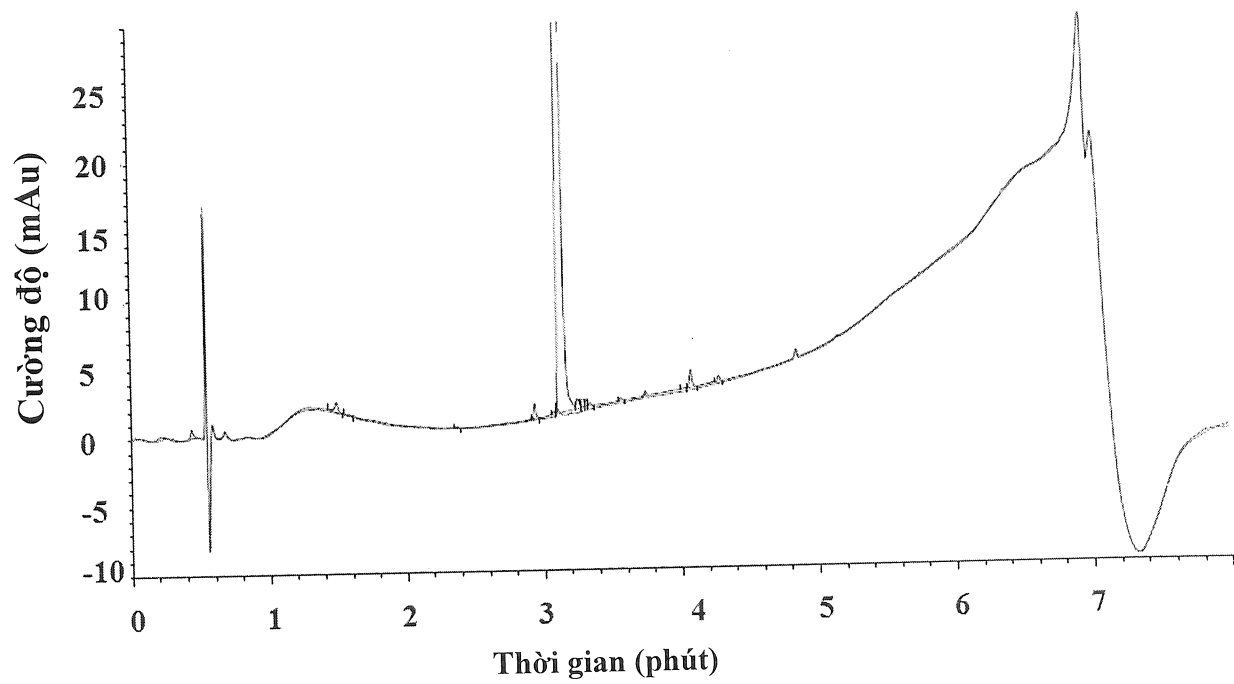


FIG. 13A

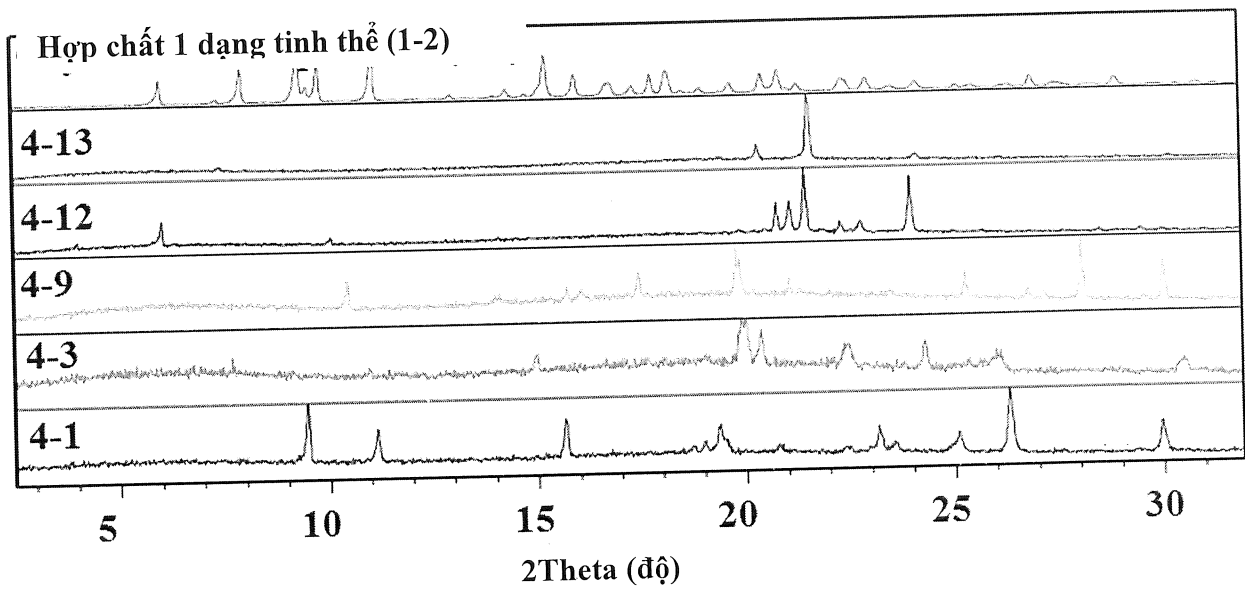


FIG. 13B

14/28

Hợp chất 1 dạng tinh thể (1-2)

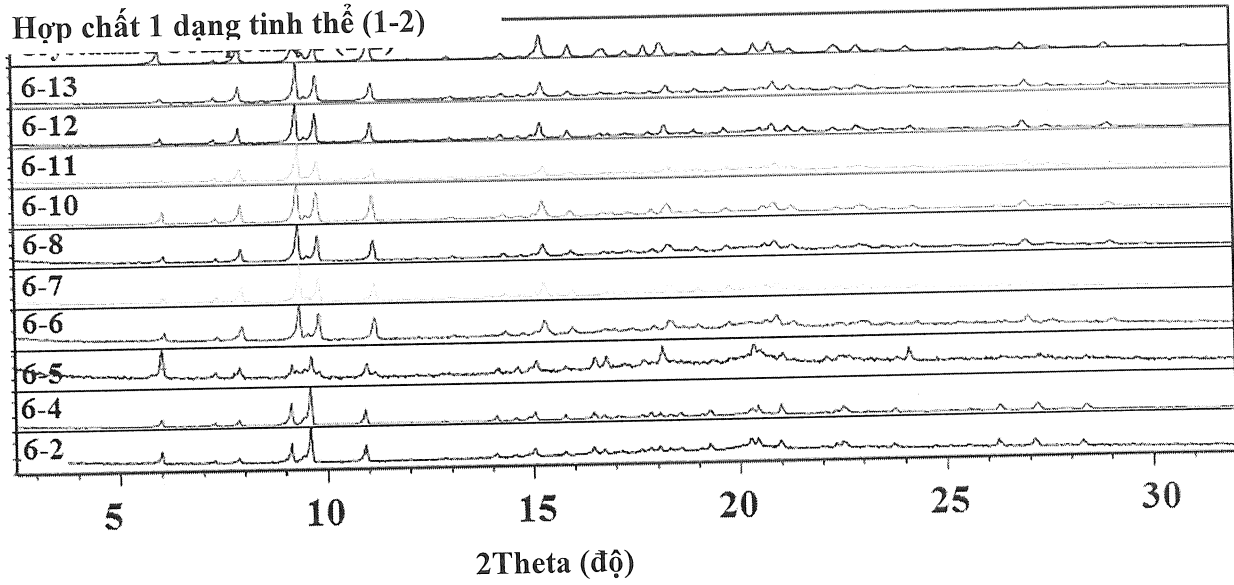


FIG. 14A

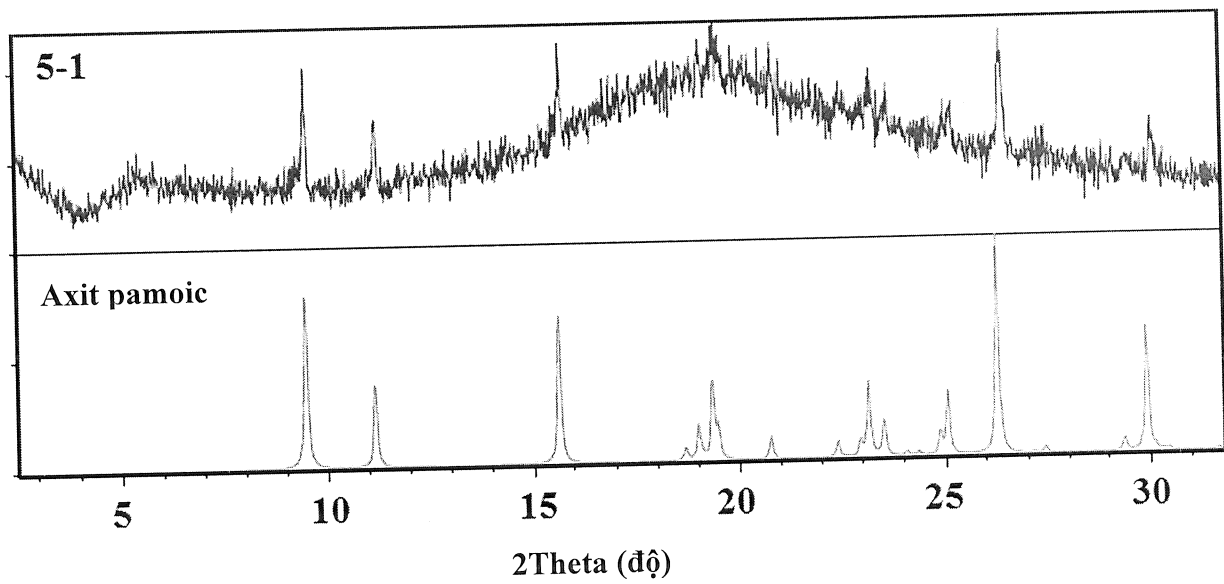


FIG. 14B

15/28

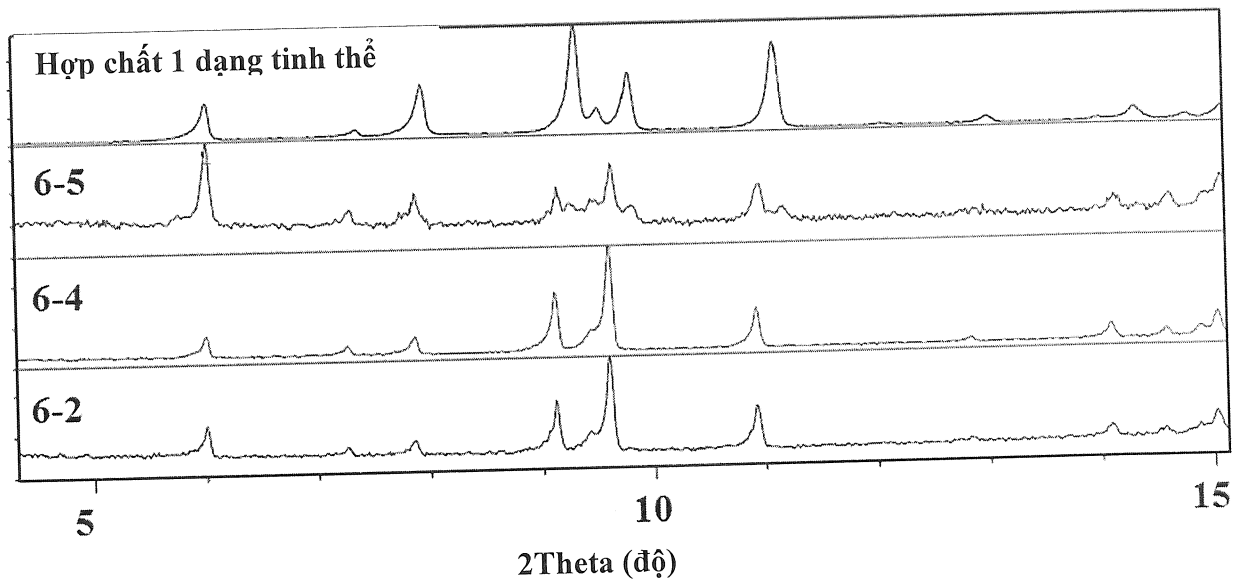


FIG. 15A

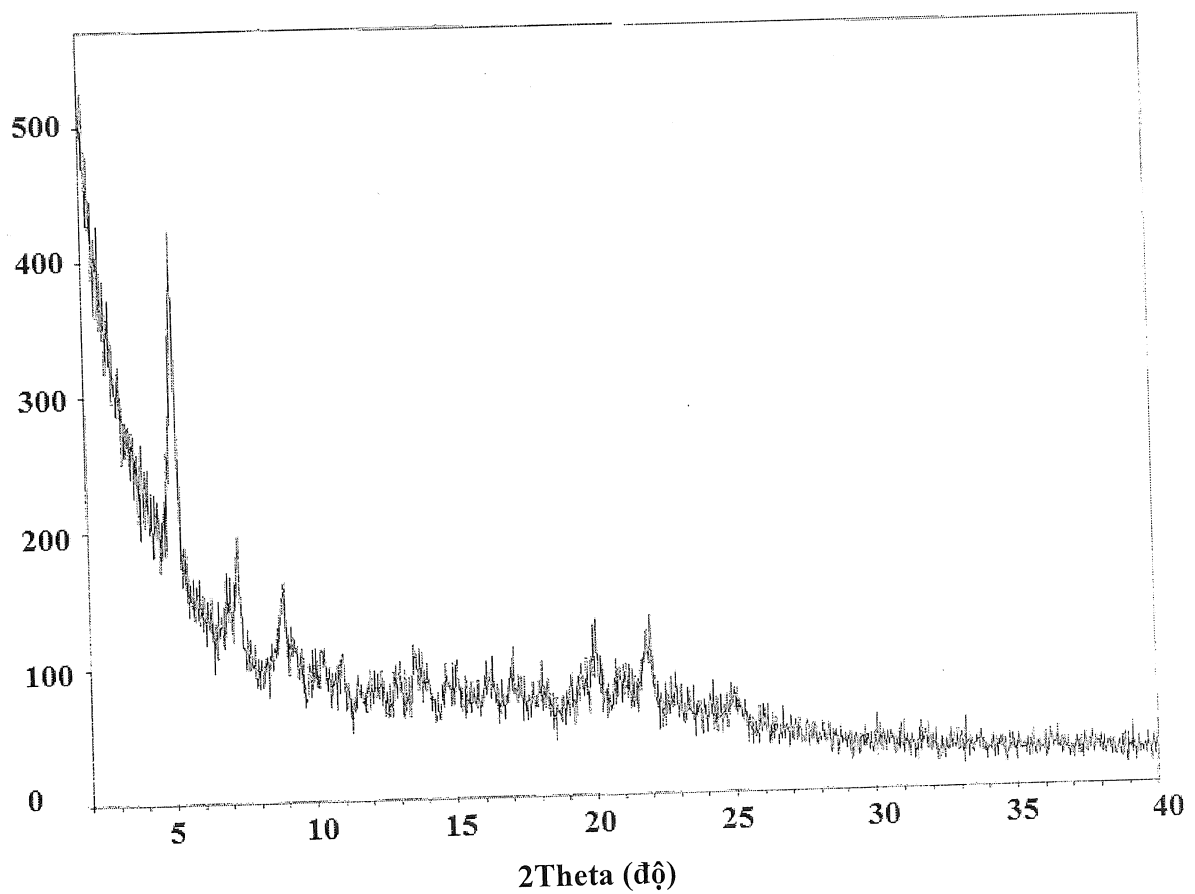
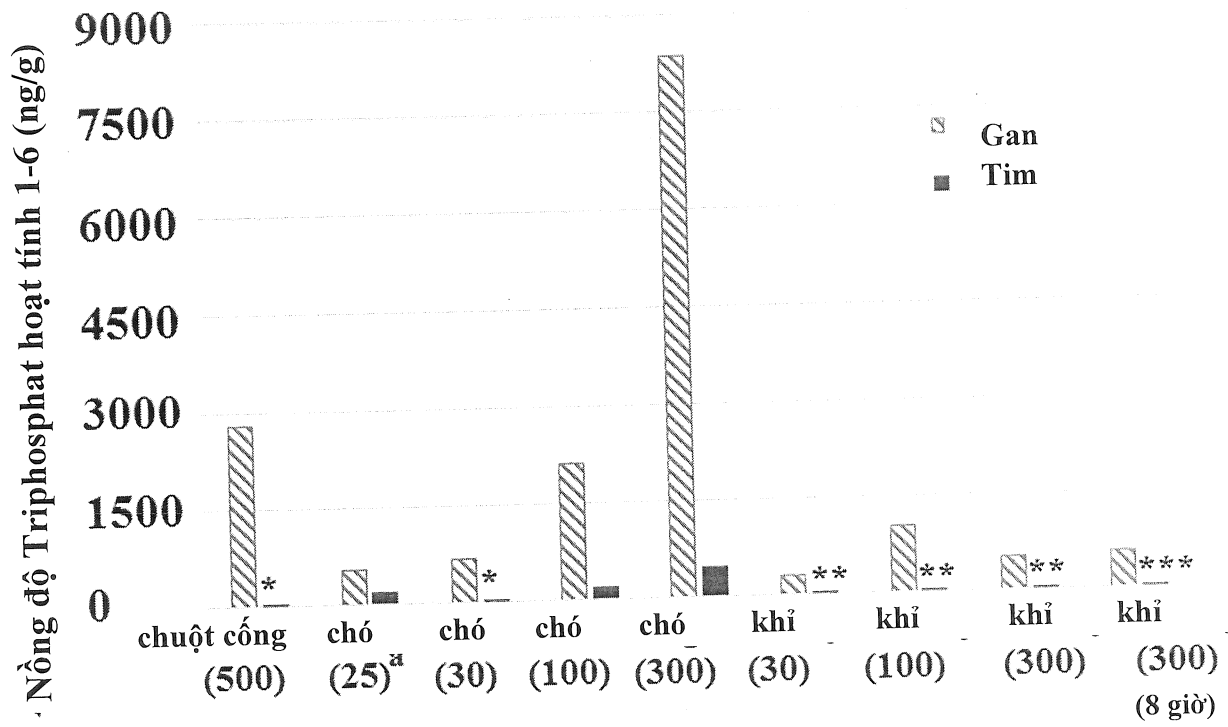


FIG. 15B

16/28



Loại (liều Hợp chất 2 tính bằng mg/kg)

^ᵃHợp chất 1 được định liều

FIG. 16A

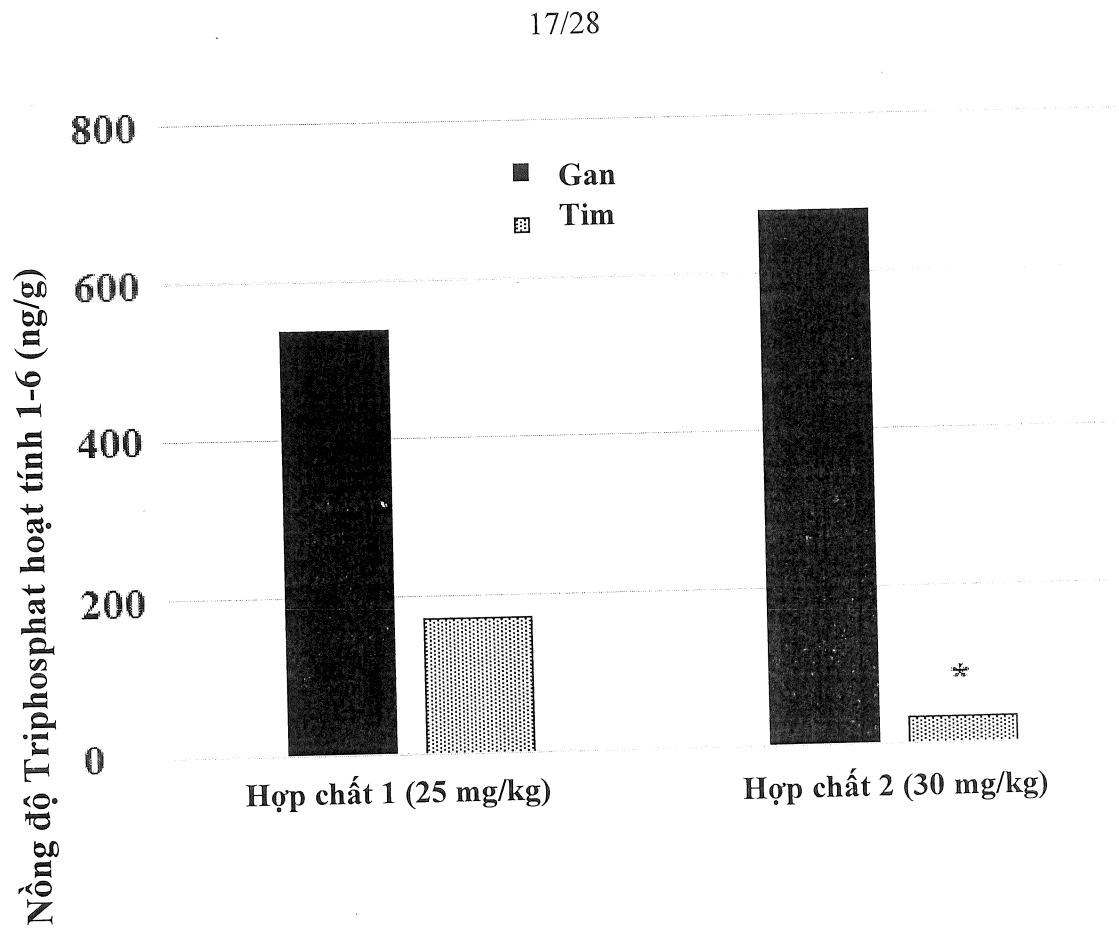


FIG. 16B

18/28

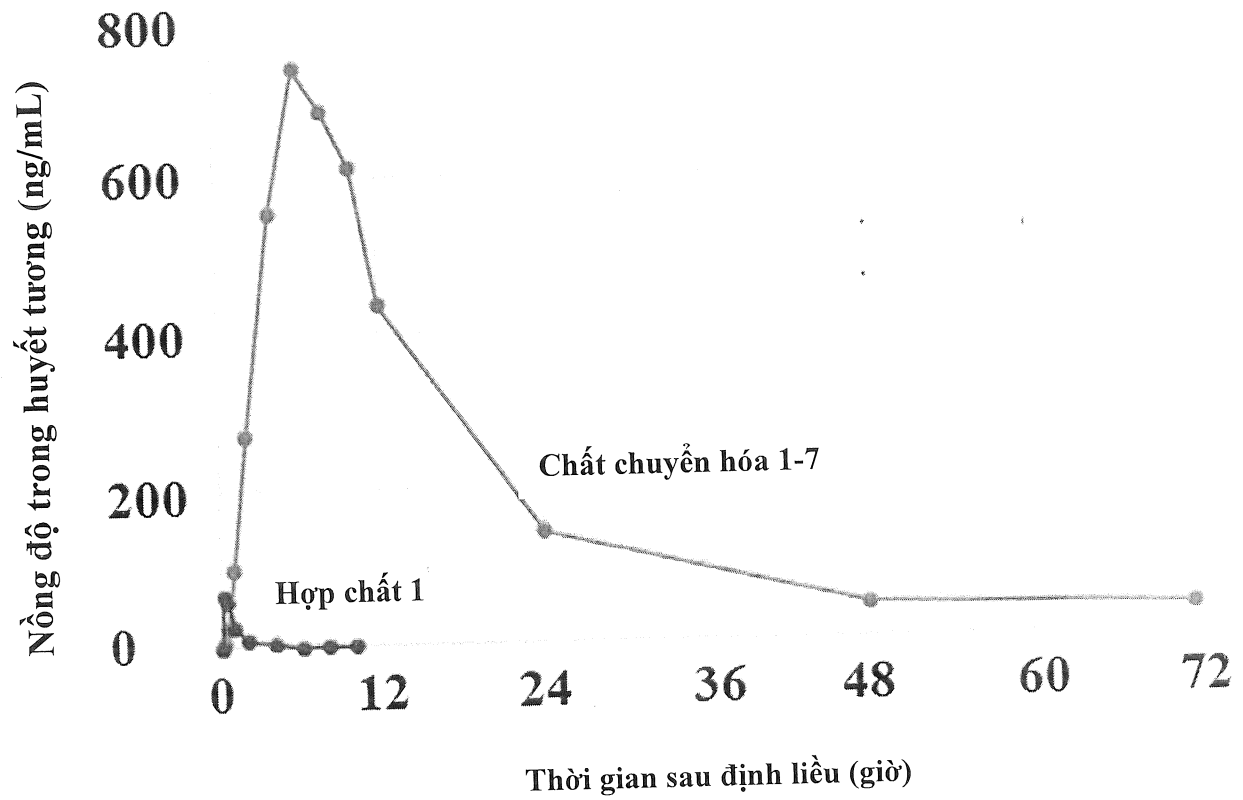


FIG. 17

19/28

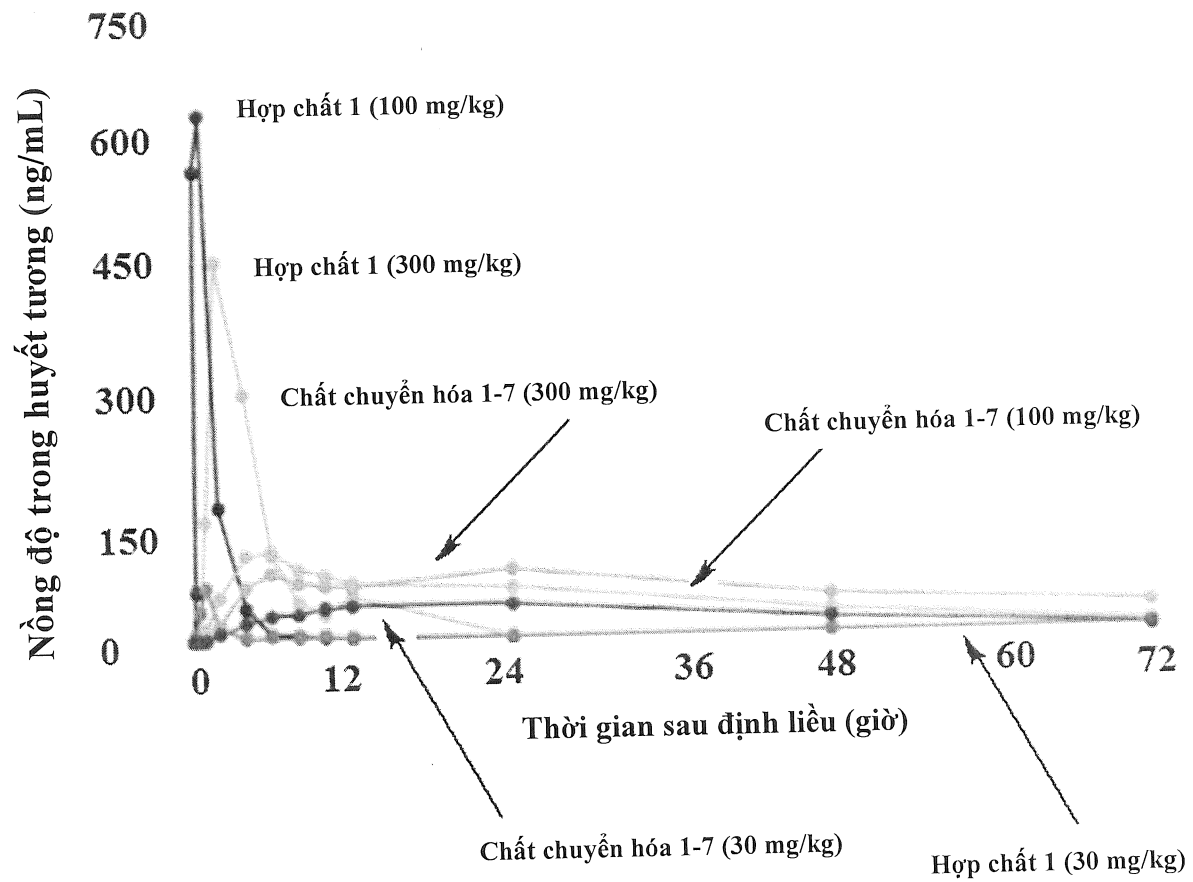


FIG. 18

20/28

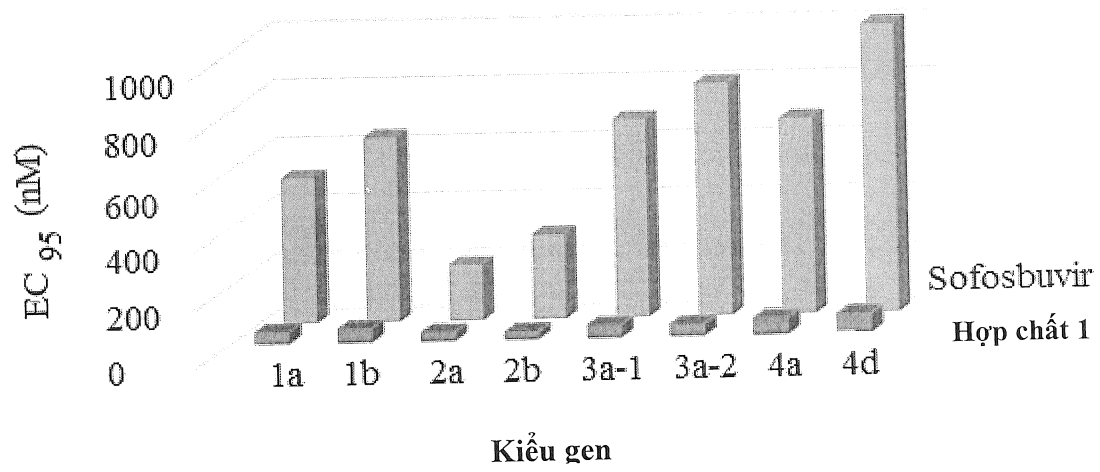


FIG. 19

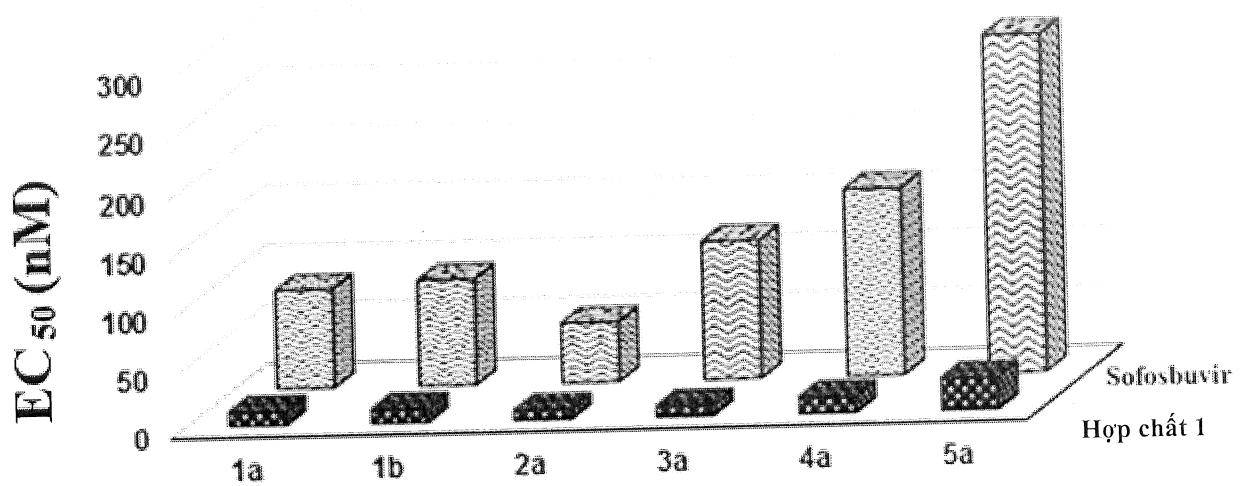


FIG. 20

21/28

PK huyết tương của Hợp chất 1

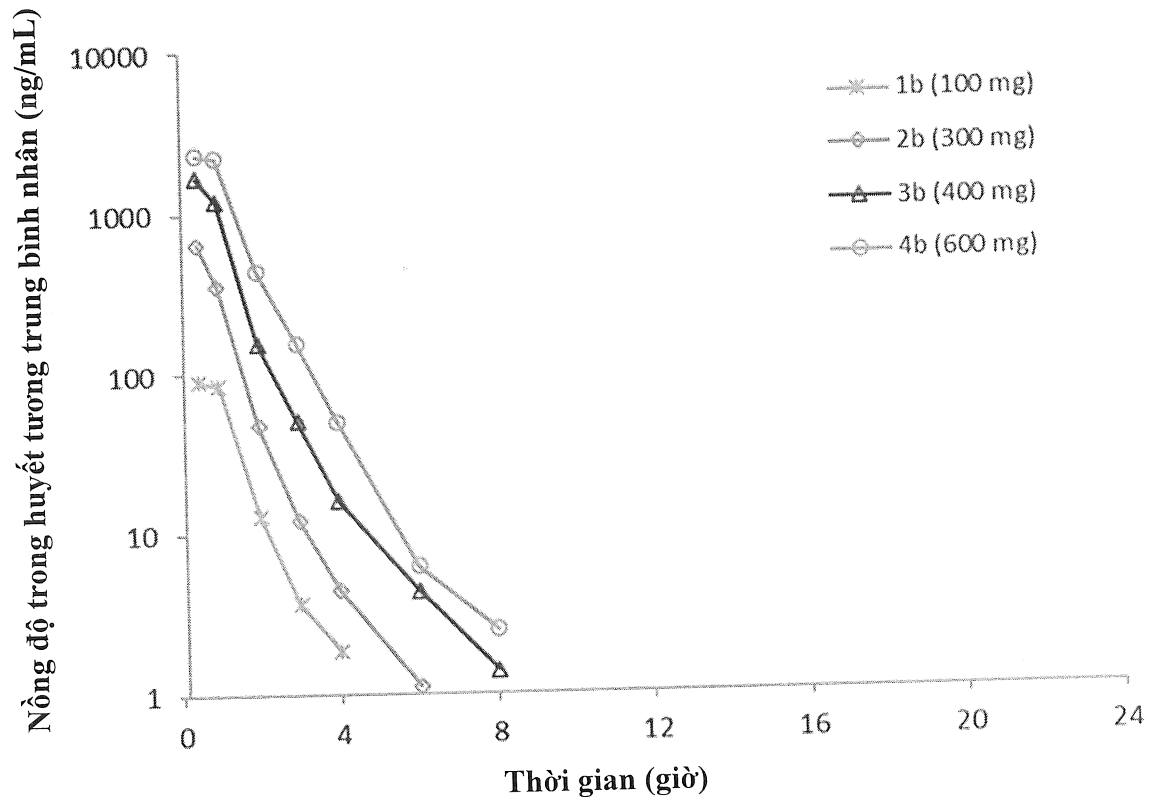


FIG. 21

22/28

PK huyết tương của chất chuyển hóa 1-7

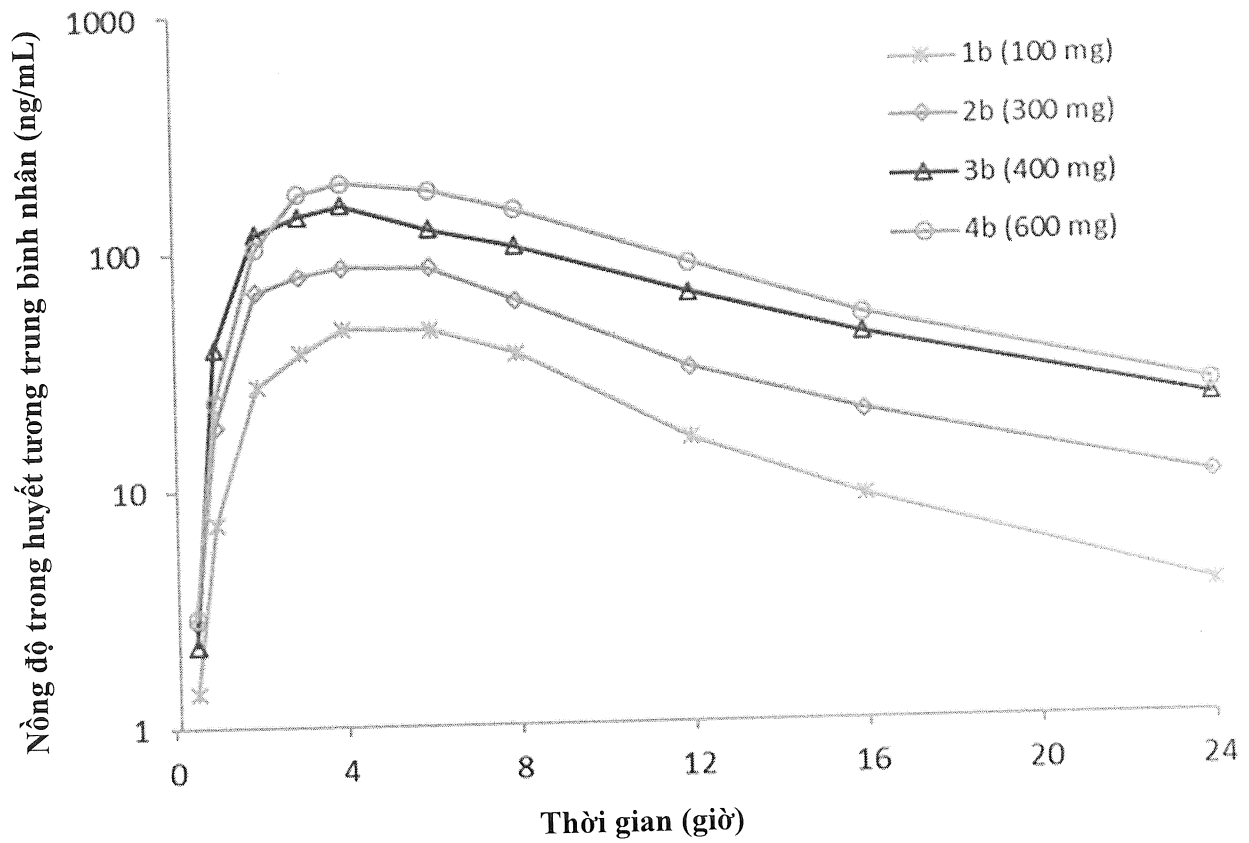


FIG. 22

23/28

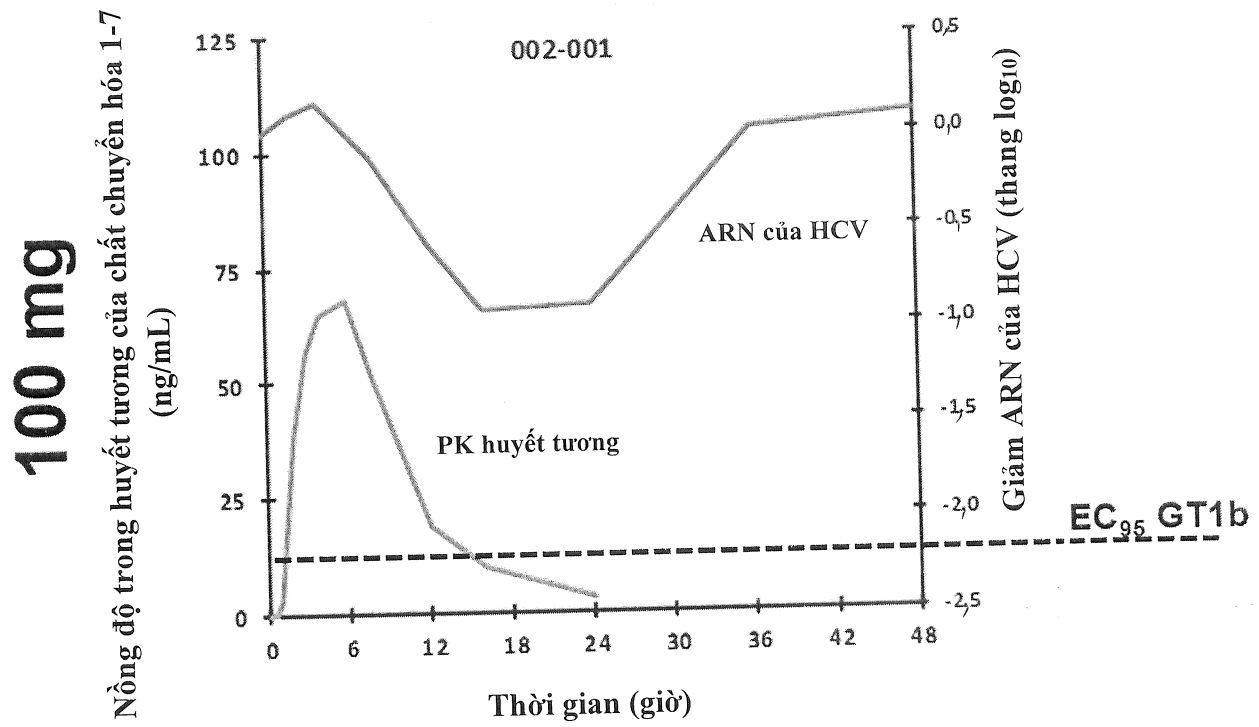


FIG. 23A

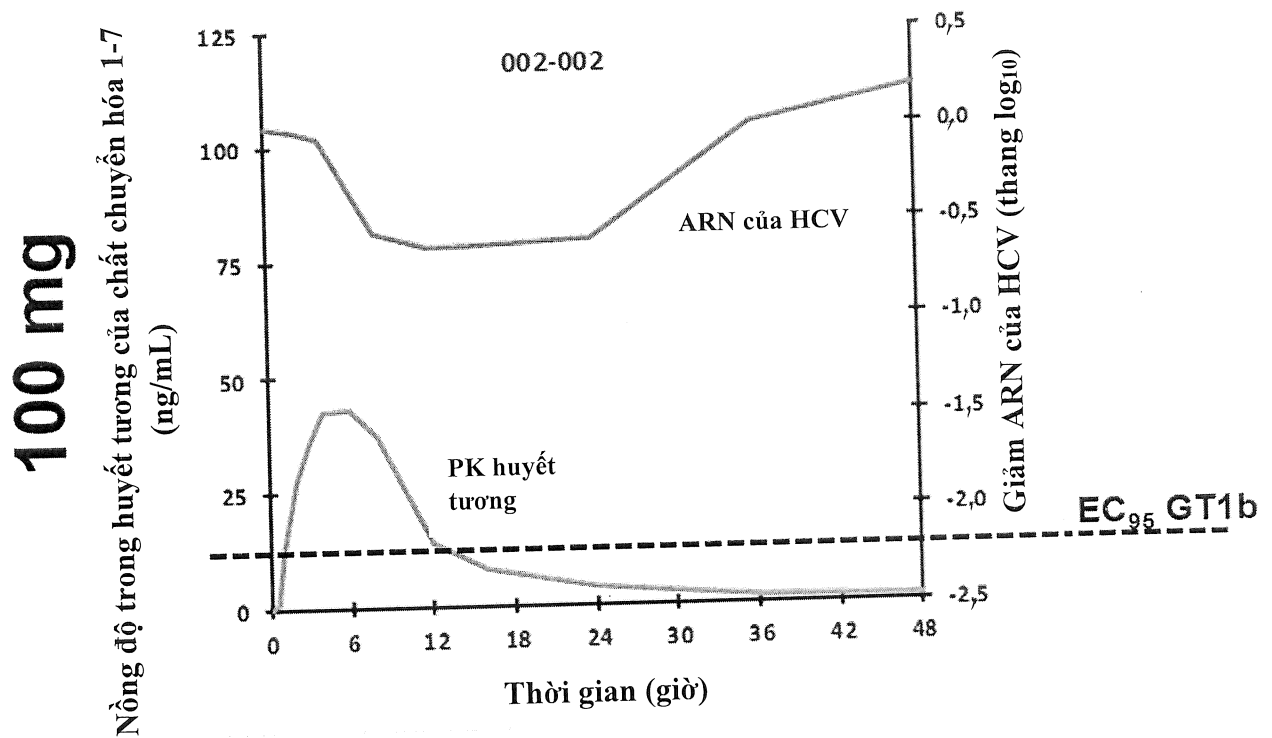


FIG. 23B

24/28

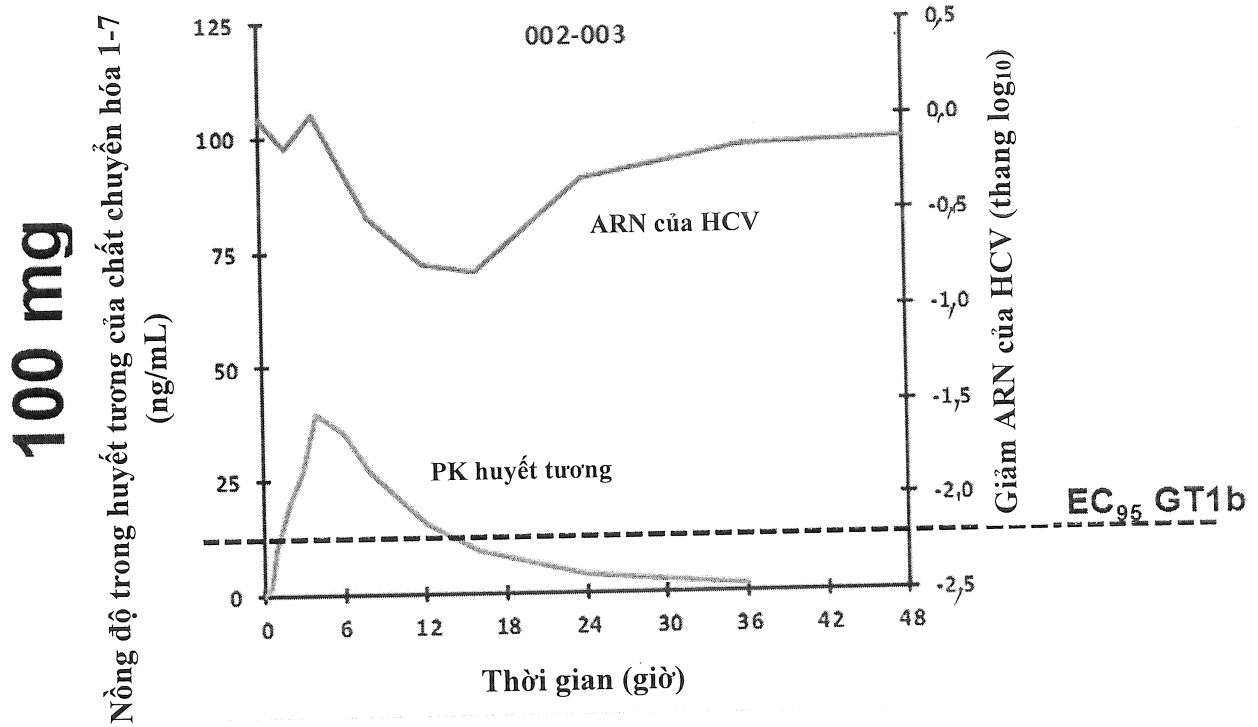


FIG. 23C

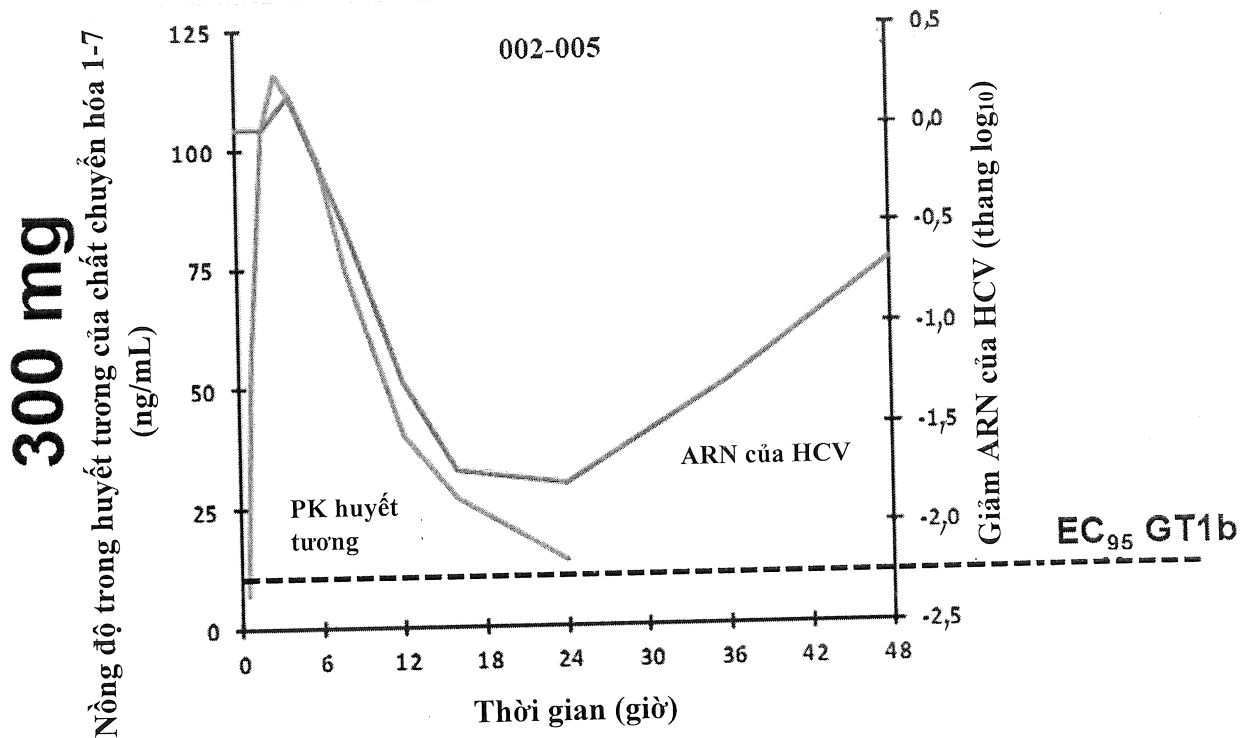


FIG. 23D

25/28

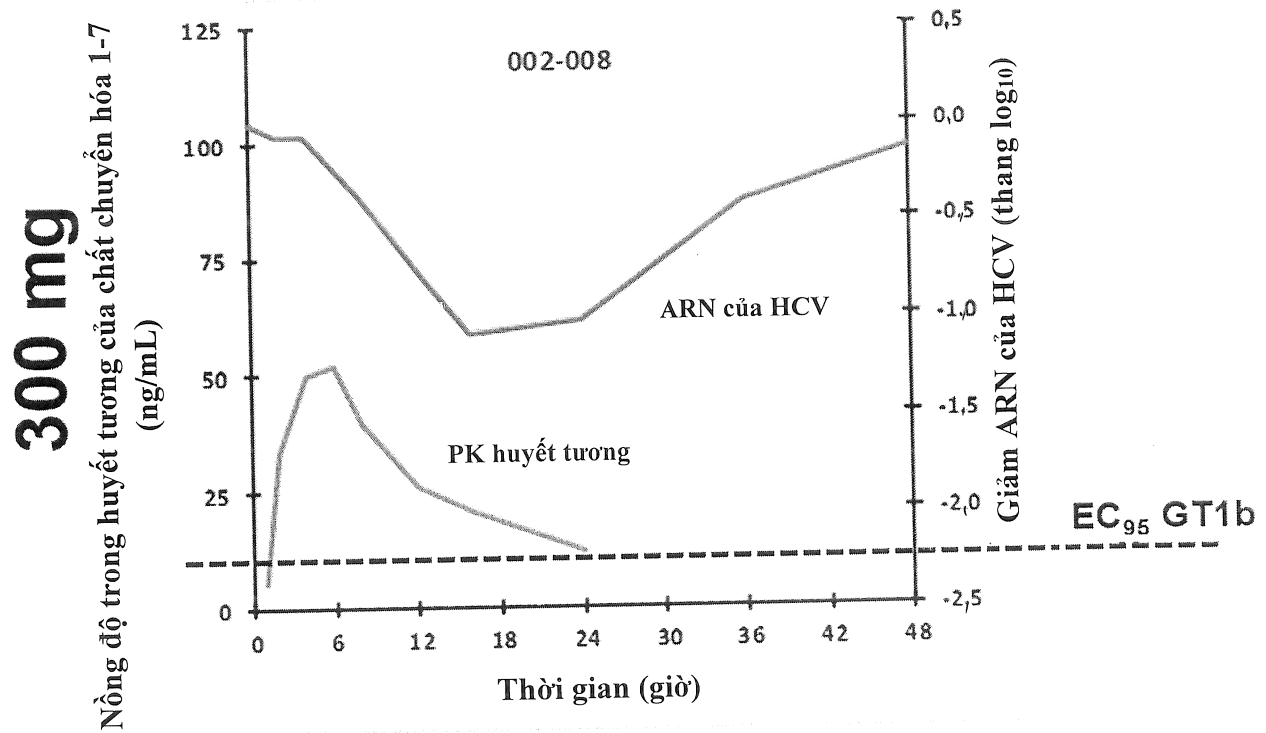


FIG. 23E

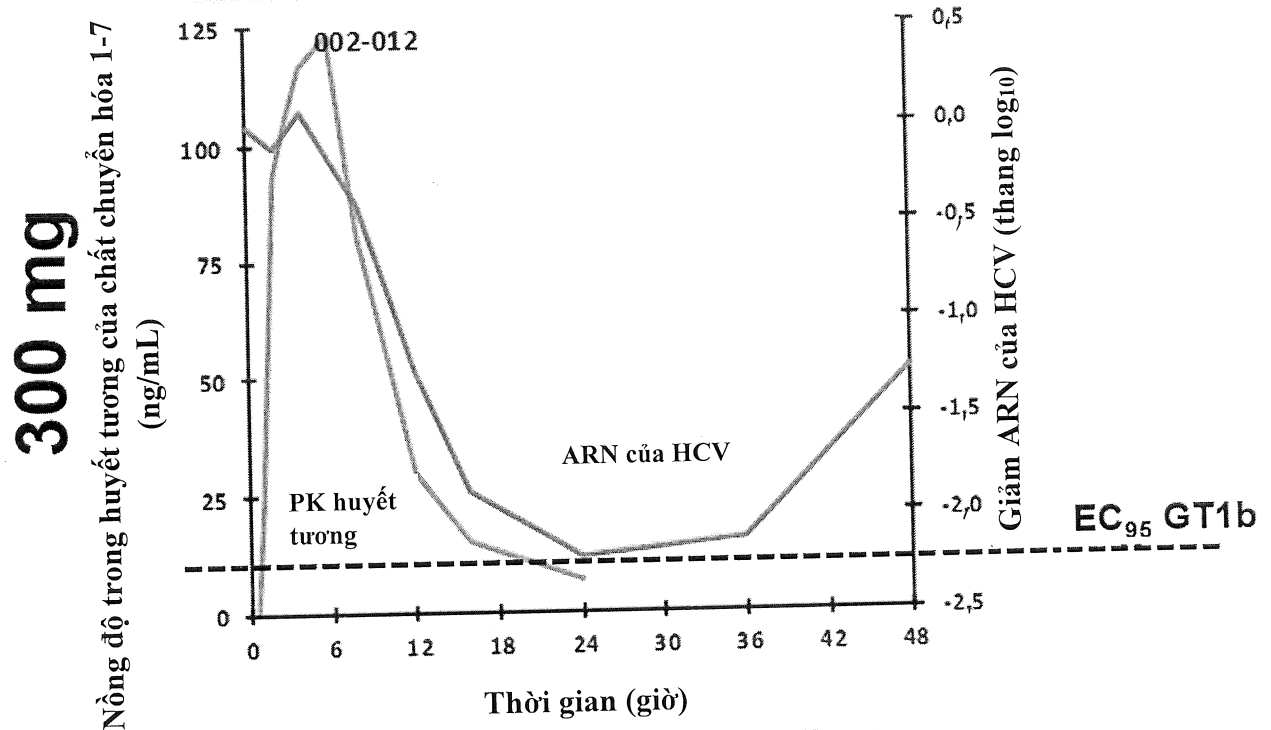


FIG. 23F

26/28

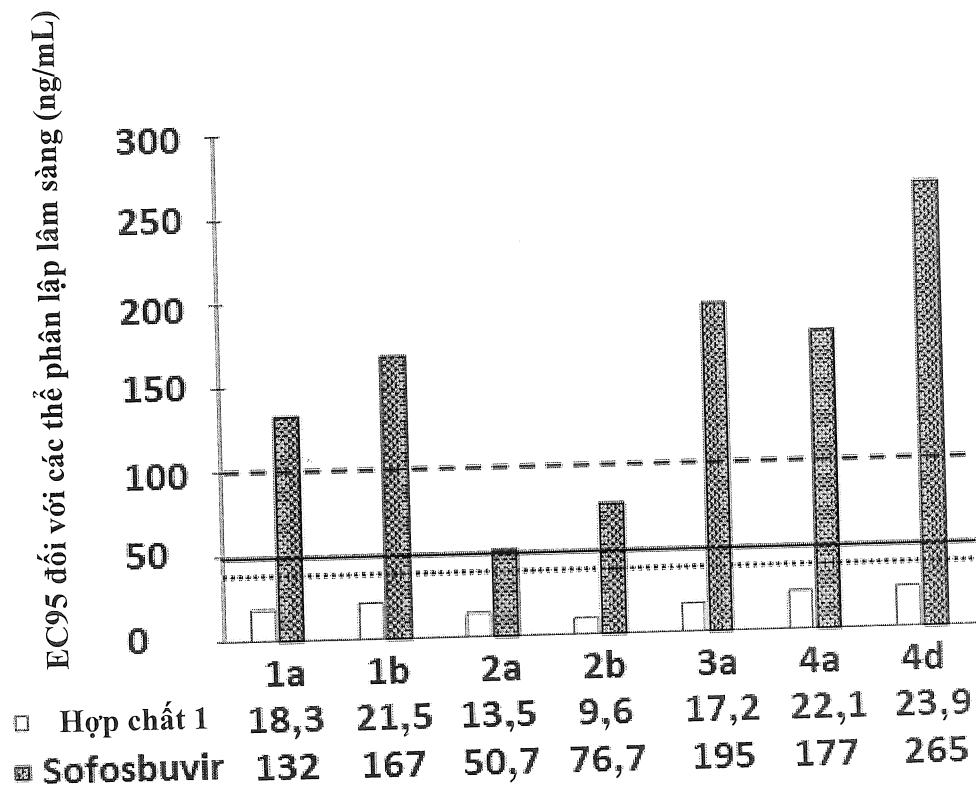


FIG. 24

27/28

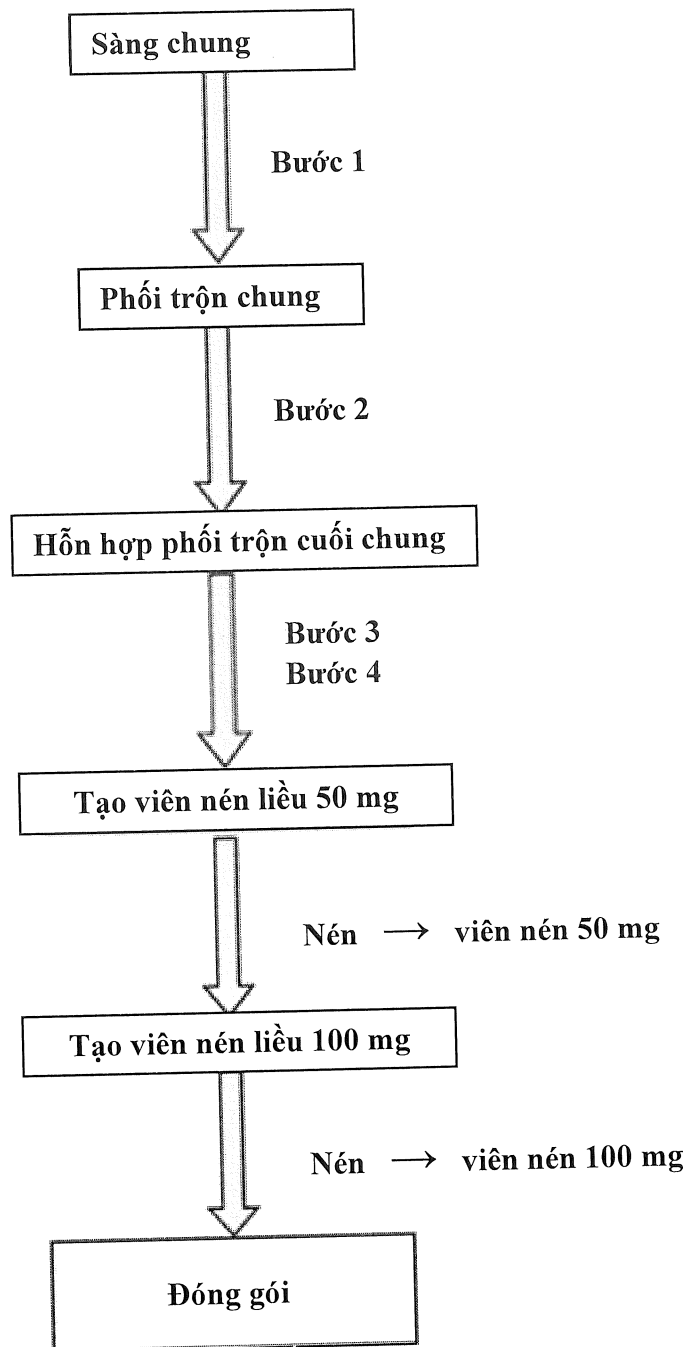


FIG. 25

28/28

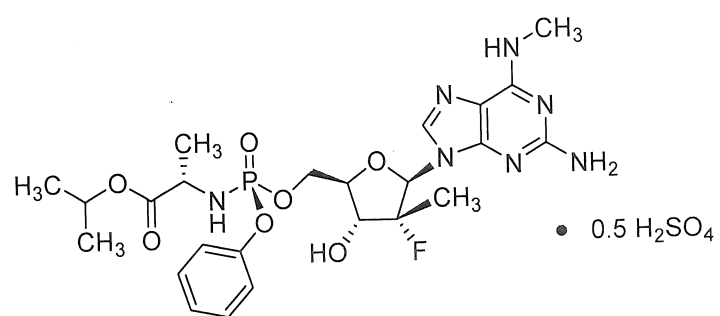


FIG. 26