



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C07D 207/16; A61K 31/5377; A61P 3/04 (13) B



1-0053549

(21) 1-2021-07431 (22) 06/11/2020
(86) PCT/KR2020/015462 06/11/2020 (87) WO2021/091283 14/05/2021
(30) 10-2019-0141649 07/11/2019 KR
(45) 25/11/2025 452 (43) 25/08/2022 413A
(73) LG CHEM, LTD. (KR)
128, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07336 Republic of Korea
(72) KANG, Seung Wan (KR); PARK, Hee Dong (KR); PARK, Hee Dong (KR); YEO,
Su jin (KR); PARK, Hyun Seo (KR); HONG, Ji Ho (KR); AHN, Hye Won (KR);
CHOI, Eun Sil (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

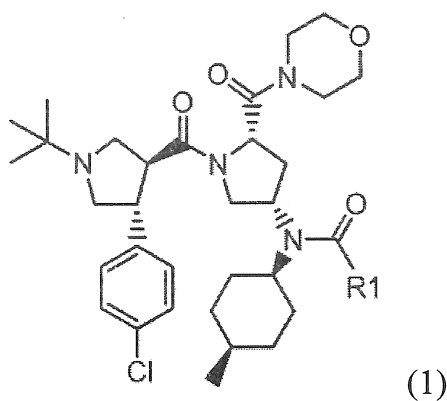
(54) HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH CHỦ VẬN ĐỐI VỚI THỤ THỂ MELANOCORTIN-4 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(21) 1-2021-07431

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có hoạt tính chủ vận rất tốt đối với các thụ thể melanocortin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (1), dược phẩm chứa hợp chất này làm hoạt chất, và mô tả việc sử dụng nó, và hợp chất theo sáng chế có hoạt tính chủ vận rất tốt đối với các thụ thể melanocortin-4 và đặc biệt hữu ích đối với việc phòng hoặc điều trị bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh viêm và chứng rối loạn cương dương.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất có hoạt tính chủ vận rất tốt đối với các thụ thể melanocortin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức 1, được phẩm chứa hợp chất này làm hoạt chất, và mô tả việc sử dụng nó, và hợp chất theo sáng chế có hoạt tính chủ vận rất tốt đối với các thụ thể melanocortin-4 và có thể là đặc biệt hữu ích đối với việc phòng hoặc điều trị bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh viêm và chứng rối loạn cương dương:



trong đó R1 là C₂-C₅ alkyl.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein leptin là một loại hormon tiết ra bởi các tế bào mỡ trong cơ thể (tế bào tạo mỡ), và lượng tiết của nó tăng khi hàm lượng chất béo trong cơ thể tăng. Protein leptin điều chỉnh các chức năng của các loại neuropeptit (peptit thần kinh) khác nhau đã được tạo ra trong vùng dưới đồi, do đó điều chỉnh sự thèm ăn, hàm lượng chất béo trong cơ thể và các chức năng in vivo khác nhau bao gồm quá trình chuyển hóa năng lượng (Schwartz, et al., Nature 404, 661-671 (2000)). Việc truyền tín hiệu thèm ăn và việc kiểm soát cân nặng của protein leptin được thực hiện thông qua sự điều chỉnh nhiều yếu tố sinh ra sau đó, trong đó tiêu biểu nhất là melanocortin, peptit liên quan đến agouti (AgRP) và hormon neuropeptit Y (NPY).

Khi nồng độ leptin trong máu tăng do quá nhiều calo trong cơ thể sống, sự tiết hormon protein proopiomelanocortin (POMC) trong tuyến yên tăng, và mức độ sản xuất AgRP và NPY giảm. Alpha-MSH (hormon kích thích tế bào sắc tố), là một hormon peptit nhỏ, được sản sinh từ các tế bào thần kinh POMC, và hormon này là chất chủ vận của thụ thể melanocortin-4 (MC4R) của các tế bào thần kinh bậc hai và dẫn đến việc làm giảm cảm giác thèm ăn. Mặt khác, khi nồng độ leptin giảm do thiếu calo, mức độ biểu hiện của AgRP mà là chất đối kháng MC4R sẽ tăng và mức độ biểu hiện của NPY cũng tăng, dẫn đến việc làm tăng cảm giác thèm ăn. Tức là, tùy thuộc vào các thay đổi về leptin, hormon alpha-MSH và hormon AgRP liên quan đến việc điều chỉnh sự thèm ăn bởi việc trở thành chất chủ vận và đối kháng đối với MC4R.

Hormon alpha-MSH gây ra các phản ứng sinh lý khác nhau bởi việc gắn kết với 3 phân nhóm của MCR ngoài MC4R. Cho đến nay, năm phân nhóm của MCR đã được nhận diện. Trong số các phân nhóm này, đã biết rằng MC1R chủ yếu được biểu hiện trong tế bào da và liên quan đến việc tạo hạt sắc tố melanin, MC2R chủ yếu được biểu hiện ở tuyến thượng thận và có liên quan đến việc sản sinh hormon glucocorticoid, và duy nhất ACTH (hormon vỏ thượng thận) có nguồn gốc từ POMC là phối tử của chúng. MC3R và MC4R mà được biểu hiện chủ yếu trong hệ thần kinh trung ương có liên quan tới sự điều chỉnh cảm giác thèm ăn, quá trình chuyển hóa năng lượng và hiệu quả tích trữ chất béo trong cơ thể, và MC5R mà được biểu hiện trong các mô khác nhau đã biết là điều chỉnh chức năng ngoại tiết (Wikberg, et al., Pharm Res 42 (5) 393-420 (2000)). Cụ thể, việc kích hoạt thụ thể MC4R có tác dụng làm giảm thể trọng một cách có hiệu quả bởi việc làm giảm cảm giác thèm ăn và tăng mức độ chuyển hóa năng lượng và do đó được chứng minh là có tác động chính trong việc phát triển thuốc chữa bệnh béo phì (Xem các bài báo: Wikberg, Eur J. Pharmacol 375, 295-310 (1999)); Wikberg, et al., Pharm Res 42 (5) 393-420 (2000); Douglas et al., Eur J Pharm 450, 93-109 (2002); và O'Rahilly et al., Nature Med 10, 351-352 (2004)).

Vai trò của MC4R trong việc kiểm soát cảm giác thèm ăn và thể trọng đã được chứng minh chủ yếu thông qua một thử nghiệm ở mô hình động vật có biểu hiện bất thường của protein agouti (chuột agouti). Trong trường hợp chuột agouti,

đã thấy rằng protein agouti được biểu hiện với nồng độ cao trong hệ thần kinh trung ương và có tác động như một chất đối kháng của MC4R trong vùng dưới đồi do sự đột biến gen, do đó gây ra bệnh béo phì (Yen, TT et al. , FASEB J. 8, 479-488 (1994); và Lu D., et al. Nature 371, 799-802 (1994)). Với các kết quả nghiên cứu tiếp theo, đã thấy rằng AgRP (peptit có liên quan đến agouti) tương tự như protein agouti được biểu hiện trong dây thần kinh vùng dưới đồi, và AgRP cũng đã biết là có liên quan đến sự điều chỉnh cảm giác thèm ăn dưới dạng chất đối kháng đối với MC4R (Shutter, et al., Genes Dev., 11, 593-602 (1997); và Ollman, et al. Science 278, 135-138 (1997)).

Việc cho động vật dùng alpha-MSH trong não mà là chất chủ vận MC4R in vivo có tác dụng làm giảm cảm giác thèm ăn và nếu SHU9119 (peptit) hoặc HS014 (peptit) mà là các chất đối kháng MC4R được dùng để điều trị bệnh như vậy, lại có tác động làm tăng cảm giác thèm ăn (Kask et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 245, 90-93 (1998)). Ngoài ra, trong một thử nghiệm trên động vật bằng cách sử dụng Melanotan II (MTII, Ac-Nle-c [Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys] -NH₂) và HP228 để làm chất chủ vận nhằm mục đích như vậy, thì sau khi dùng trong não, trong phúc mạc hoặc dưới da, hiệu quả ức chế cảm giác thèm ăn, giảm thể trọng và hiệu quả tăng mức độ chuyển hóa năng lượng đã được xác nhận. (Thiele TE, et al. Am J Physiol 274 (1 Pt 2), R248-54 (1998); Lee MD, et al. FASEB J 12, A552 (1998); Murphy B., et al. J Appl Physiol 89 , 273-82 (2000)). Ngược lại, khi cho động vật sử dụng SHU9119, việc lượng thức ăn tiêu thụ và mức tăng trọng không đổi và đáng kể được thể hiện, cho thấy một bằng chứng được lý là chất chủ vận MCR có thể được sử dụng để điều trị bệnh béo phì. Tác dụng làm giảm cảm giác thèm ăn mà được thể hiện rõ ràng trong quá trình sử dụng MTII không được thể hiện ở chuột có gen MC4R bất hoạt, và kết quả thử nghiệm này một lần nữa chứng minh rằng tác dụng làm giảm cảm giác thèm ăn chủ yếu đạt được bởi việc kích hoạt gen MC4R (Marsh, et al., Nat Genet 21, 119-122 (1999)).

Các chất ức chế cảm giác thèm ăn mà có tác động lên hệ thần kinh trung ương được dùng chủ yếu trong các phương pháp điều trị bệnh béo phì đã và đang được phát triển cho đến nay, và hầu hết các chất ức chế này là các thuốc điều biến

tác động của các chất dẫn truyền thần kinh. Các ví dụ về chúng bao gồm các tác nhân noradrenalin (phentermin và mazindol) và fluoxetin và sibutramin, là các tác nhân gây tiết serotonin. Tuy nhiên, tác nhân điều biến dẫn truyền thần kinh tạo ra nhiều hiệu ứng khác nhau đối với các tác động sinh lý khác nhau ngoài sự ức chế cảm giác thèm ăn bởi các phân nhóm thụ thể khác nhau. Do đó, các tác nhân điều biến này không có tính chọn lọc đối với mỗi phân nhóm và có một nhược điểm lớn là kèm theo các tác dụng phụ khác nhau trong trường hợp sử dụng lâu dài.

Mặt khác, các melanocortin là các neuropeptit, chứ không phải là các chất dẫn truyền thần kinh, và dường như là tất cả các chức năng khác với chức chuyển hóa năng lượng đều là bình thường ở chuột có gen MC4R bất hoạt, các chất chủ vận melanocortin có ưu điểm là nó chỉ có thể có động làm giảm cân thông qua sự ức chế cảm giác thèm ăn mà không ảnh hưởng đến các chức năng sinh lý khác. Đặc biệt, thụ thể này là một thụ thể kết hợp với protein G (GPCR), thuộc một trong số các loại thuốc thành công nhất đã và đang được phát triển cho đến nay, và khác biệt với nhiều so với các giải pháp kỹ thuật có liên quan ở chỗ việc đảm bảo tương đối dễ dàng tính chọn lọc đối với các phân nhóm của thụ thể.

Là các ví dụ về việc sử dụng thụ thể melanocortin làm điểm tác động, các Công bố đơn Quốc tế WO 2008/007930 và WO 2010/056022 mô tả các hợp chất làm các chất chủ vận của thụ thể melanocortin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất mới có công thức (1), có hoạt tính chủ vận có tính chọn lọc rất tốt đối với các thụ thể melanocortin, cụ thể là các thụ thể melanocortin-4 (MC4R), hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra hợp chất có công thức (1).

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm có tính chủ vận đối với thụ thể melanocortin chứa hợp chất có công thức (1), hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, làm hoạt chất.

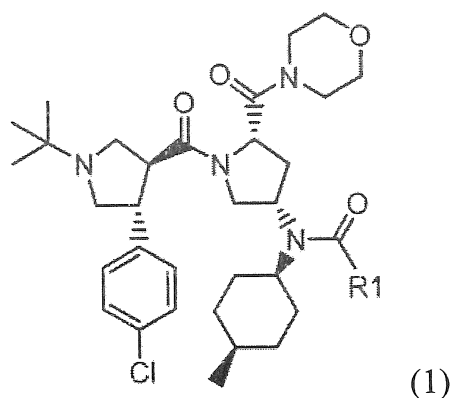
Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (1), hoặc chất

đồng phân hoặc muối được dụng của nó để phòng hoặc điều trị bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh viêm và chứng rối loạn cương dương.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng hoặc điều trị bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh viêm và chứng rối loạn cương dương, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng hợp chất có công thức (1), hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nhằm đạt được các mục đích trên, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 1, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó:



trong đó R1 là C₂-C₅ alkyl.

Hợp chất có công thức 1 theo sáng chế có thể tạo ra muối được dụng.

Ngoài ra, do các hợp chất theo sáng chế có thể có tâm cacbon không đối xứng và trục không đối xứng hoặc mặt phẳng không đối xứng, các hợp chất này có thể có mặt dưới dạng các chất đồng phân cis hoặc trans, các chất đồng phân R hoặc S, chất triệt quang, các hỗn hợp chất đồng phân lập thể, và các chất đồng phân lập thể riêng, và tất cả các chất đồng này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

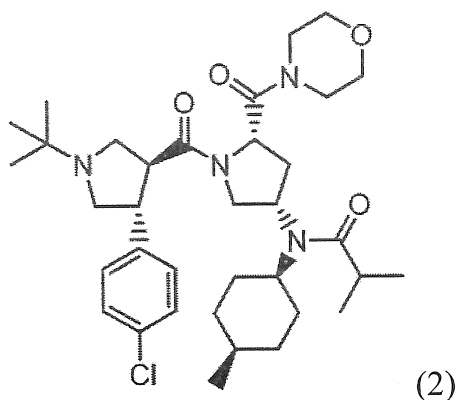
Trong bản mô tả sáng chế này, trừ khi có quy định khác, hợp chất có công thức 1 được sử dụng để chỉ bao gồm toàn bộ hợp chất có công thức 1, các muối được dụng và các chất đồng phân của nó.

Theo một phương án của sáng chế, R1 trong công thức 1 là alkyl có 2 tới 4 nguyên tử cacbon. Theo một phương án khác của sáng chế, R1 trong công thức 1

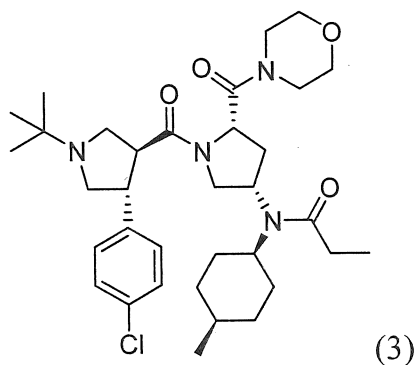
là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 2 tới 4 nguyên tử cacbon, ví dụ, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, hoặc tert-butyl.

Theo một phương án khác của sáng chế, R1 trong công thức 1 là alkyl có 2 hoặc 3 nguyên tử cacbon. Theo một phương án khác của sáng chế, R1 trong công thức 1 là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 2 hoặc 3 nguyên tử cacbon, ví dụ etyl, n-propyl, hoặc isopropyl.

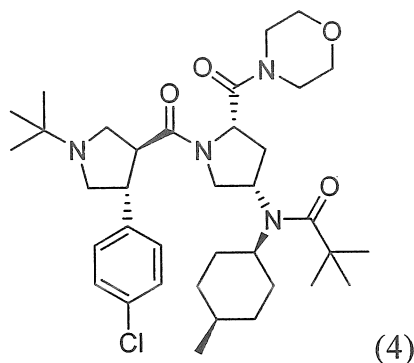
Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất có công thức 1 là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramit có công thức 2:



Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất có công thức 1 là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamit có công thức 3:



Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất có công thức 1 là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamit có công thức 4:



Theo một phương án khác của sáng chế, các ví dụ về muối được dụng bao gồm các muối cộng axit được tạo ra bởi axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iodohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic, nhưng không chỉ giới hạn trong số này.

Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là etyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iodohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là n-propyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iodohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là isopropyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iodohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric,

axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là n-butyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

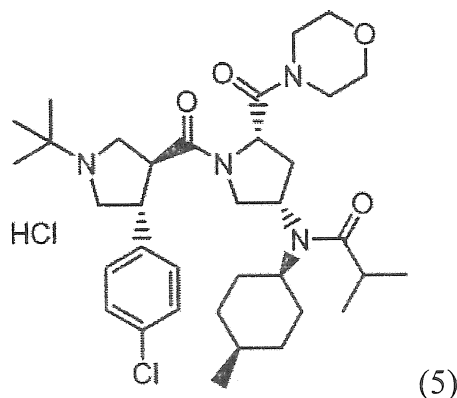
Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là isobutyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là sec-butyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

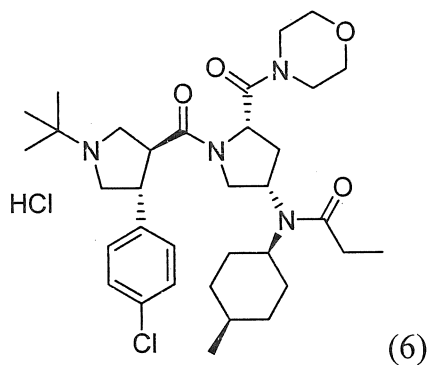
Theo một phương án của sáng chế, hợp chất này là muối có được tính của hợp chất có công thức 1, trong đó R1 là tert-butyl và muối này là muối của axit vô cơ như axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric, và axit iohydric; axit carboxylic hữu cơ như axit tartaric, axit formic, axit xitric, axit axetic, axit trichloroaxetic, axit trifloroaxetic, axit gluconic, axit benzoic, axit lactic, axit fumaric, và axit maleic; và axit sulfonic như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, và axit naphtalensulfonic.

Theo một phương án khác của sáng chế, muối được dụng này là hydroclorua.

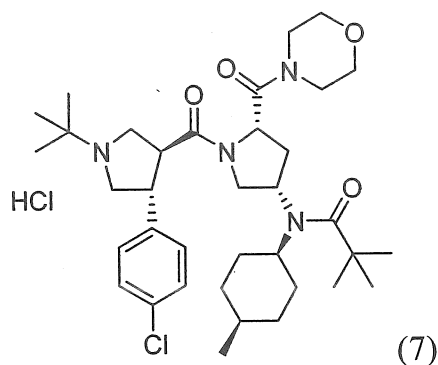
Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất có công thức 1 là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramit hydroclorua có công thức 5:



Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất có công thức 1 là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamit hydroclorua có công thức 6:

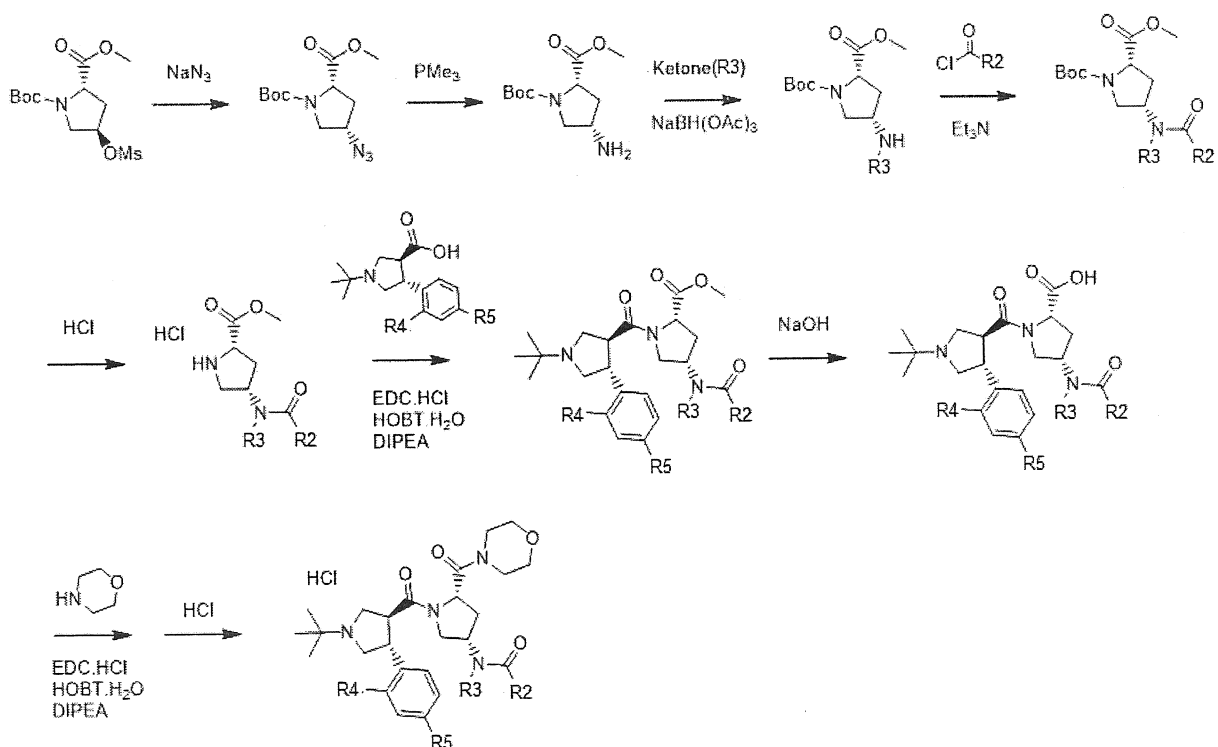


Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất có công thức 1 là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamit hydroclorua có công thức 7:



Theo một phương án khác của sáng chế, *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramit hydroclorua có công thức 5, *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamit hydroclorua có công thức 6, và *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamit hydroclorua có công thức 7 có thể được tạo ra theo sơ đồ phản ứng 1 sau.

Sơ đồ phản ứng 1



Trong sơ đồ phản ứng 1:

R2 là C₁-C₅ alkyl;

R3 là C₃-C₈ xycloalkyl không được tể hoặc đã được thế bằng 1 hoặc 2 C₁-C₅ alkyl; và

mỗi R4 và R5 độc lập là hydro hoặc halogen.

Hợp chất có công thức 1 theo sáng chế có hoạt tính chủ vận rất tốt đối với các thụ thể melanocortin, đặc biệt là các thụ thể melanocortin-4 (MC4R), và do vậy sáng chế cũng đề xuất được phẩm có tính chủ vận đối với thụ thể melanocortin chứa hợp chất có công thức 1, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dùng của nó làm hoạt chất, cùng với chất mang được dùng. Đặc biệt, dược phẩm theo sáng chế có hiệu quả rất tốt để phòng hoặc điều trị bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh viêm và chứng rối loạn cương dương, nhưng không chỉ giới hạn trong số này.

Trong bản mô tả sáng chế này, thuật ngữ “chất mang” được dùng để chỉ hợp chất tạo điều kiện thuận lợi cho việc tiêm truyền hợp chất này vào trong các tế bào hoặc mô.

Khi hợp chất theo sáng chế được dùng nhằm các mục đích lâm sàng, thì tốt hơn nếu tổng liều dùng hằng ngày cho vật chủ ở dạng liều dùng duy nhất hoặc các liều dùng riêng biệt nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10mg cho 1kg thể trọng, nhưng liều dùng cụ thể đối với mỗi bệnh nhân có thể là khác nhau tùy thuộc vào hợp chất cụ thể được sử dụng, cân nặng, giới tính, tình trạng sức khỏe và chế độ ăn uống của bệnh nhân, thời gian dùng thuốc, phương pháp dùng thuốc và tốc độ bài tiết của thuốc, hỗn hợp thuốc và mức độ nghiêm trọng của bệnh.

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng qua đường bất kỳ tùy thuộc vào mục đích. Ví dụ, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng bằng cách tiêm truyền hoặc dùng qua đường miệng.

Các thuốc tiêm truyền có thể được bào chế bằng cách sử dụng chất phân tán, chất thẩm ướt, hoặc chất tạo huyền phù thích hợp theo các kỹ thuật đã biết.

Các ví dụ về các dạng liều dùng rắn để dùng qua đường miệng bao gồm viên nang, viên nén, thuốc viên, bột, và hạt, và các dạng liều dùng rắn có thể được bào chế bằng cách trộn hợp chất có hoạt tính có công thức 1 theo sáng chế với một hoặc nhiều chất mang như chất pha loãng, chất làm trơn, chất gây rã và

chất gắn kết.

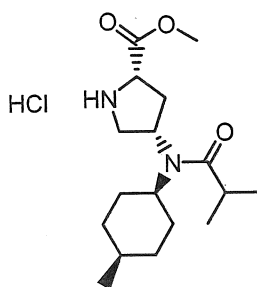
Hợp chất có công thức 1 theo sáng chế có hoạt tính chủ vận rất tốt đối với các thụ thể melanocortin, đặc biệt là các thụ thể melanocortin-4 (MC4R), và do vậy có thể được sử dụng một cách hữu ích để phòng hoặc điều trị bệnh béo phì, bệnh tiểu đường, bệnh viêm, và chứng rối loạn cương dương.

Hợp chất có công thức 1 theo sáng chế thể hiện hiệu quả hướng đích đối với thụ thể melanocortin-4, không gây lo lắng và trầm cảm đồng thời với việc có các hiệu quả giảm cân và giảm chế độ ăn kiêng, và có thể được dùng mà không có các tác dụng phụ đối với sự ức chế gen có liên quan đến ether-a-go-go của người (hERG) hoặc các vấn đề an toàn như sự đột biến gen. Ngoài ra, hợp chất có công thức 1 theo sáng chế có thể được sử dụng một cách an toàn vì không có độc tính tế bào và độc tính gan.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ điều chế và các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không chỉ được giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ điều chế 1: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua



Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra thông qua các bước A, B, C, D và E.

Bước A: Điều chế 1-(*tert*-butyl) 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidin-1,2-dicarboxylat

1-(*Tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*R*)-4-((metylsulfonyl)oxy)pyrrolidin-1,2-đicarboxylat (48,5g, 150mmol) được hoà tan trong *N,N'*-đimetylformamit (250ml) dưới khí nitơ, và natri azit (19,5g, 300ml) được bổ sung vào. Sau khi khuấy ở 80°C trong 16 giờ, dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và việc chiết được thực hiện hai lần bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua và nước, được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô (39,59g, 98%), nó được sử dụng luôn ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

$$\text{MS [M+H]} = 271 \text{ (M+1)}$$

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 4,43-4,37 (m, 1H), 4,35-4,27 (br, 1H), 3,77 (s, 1,8H), 3,76 (s, 1,2H), 3,73-3,66 (m, 1H), 3,44-3,38 (m, 1H), 2,63-2,49 (m, 1H), 2,19-2,11 (m, 1H), 1,50 (s, 4,5H), 1,44 (s, 4,5H)

Bước B: Điều chế 1-(*tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*S*)-4-aminopyrrolidin-1,2-đicarboxylat

1-(*Tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*S*)-4-azidopyrrolidin-1,2-đicarboxylat (24,59g, 91,0mmol) thu được ở bước A được hoà tan trong tetrahydrofuran (180ml), và sau đó dung dịch trimethylphosphin tetrahydro 1M (109,2ml, 109,2mmol) được bổ sung chậm vào ở 0°C. Sau khi khuấy ở nhiệt độ như vậy trong một giờ, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong ba giờ. Sau khi dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm, diclorometan (100ml) và nước (150ml) được bổ sung vào và được khuấy trong khoảng 30 phút. Sau khi các lớp được tách và được chiết thêm một lần nữa bằng diclorometan, lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan và được lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô (20,62g, 93%), nó được sử dụng luôn ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

$$\text{MS [M+H]} = 245 \text{ (M+1)}$$

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 4,27 (m, 1H), 3,77 (s, 1,8H), 3,76 (s, 1,2H), 3,75-3,67 (m, 1H), 3,50-3,42 (m, 1H), 3,22-3,17 (m, 1H), 2,58-2,47 (m, 1H), 1,82-1,71 (m, 1H), 1,48 (s, 4,5H), 1,42 (s, 4,5H)

Bước C: Điều chế 1-(*tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*S*)-4-(((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)amino)pyrrolidin-1,2-đicarboxylat

1-(*Tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*S*)-4-aminopyrrolidin-1,2-đicarboxylat (20,62g, 84,4mmol) thu được ở bước B được hoà tan trong đicloroetan (150ml), và 4-metylxcyclohexanon (9,5ml, 101,3mmol) được bổ sung vào. Natri triaxetoxymetaphosphat (26,8g, 126,6mmol) được bổ sung vào ở 0°C và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm, nước được bổ sung vào, và việc chiết được thực hiện hai lần bằng ethyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua, được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm và được tinh chế bằng cách sắc ký trên cột để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (22,9g, 80%).

MS [M+H] = 341 (M+1)

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 4,26 (m, 1H), 3,76 (s, 1,8H), 3,75 (s, 1,2H), 3,78-3,71 (m, 1H), 3,49-3,40 (m, 1H), 3,22-3,16 (m, 1H), 2,69-2,60 (br, 1H), 2,58-2,46 (m, 1H), 1,87-1,77 (m, 1H), 1,73-1,63 (m, 1H), 1,62-1,35 (m, 8H), 1,48 (s, 4,5H), 1,42 (s, 4,5H), 0,96 (d, 3H)

Bước D: Điều chế 1-(*tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-1,2-đicarboxylat

1-(*Tert*-butyl) 2-metyl (2*S*,4*S*)-4-(((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)amino)pyrrolidin-1,2-đicarboxylat (37,29g, 109,5mmol) thu được ở bước C được hoà tan trong điclorometan (500ml), trietyl amin (61,1ml, 438,1mmol) được bổ sung vào, và isobutyryl clorua (11,7ml, 219mmol) được bổ sung chậm vào ở 0°C. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ, dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm, dung dịch nước natri hydro cacbonat được bổ sung vào, và việc chiết được thực hiện hai lần bằng ethyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua và nước, được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm và được tinh chế bằng cách sắc ký trên cột để thu được hợp chất nêu ở đề mục này

(38,79g, 86%).

MS $[M+H] = 411 (M+1)$

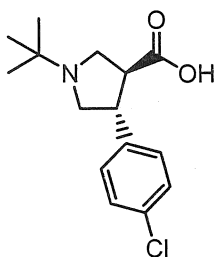
^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 4,27 (m, 1H), 3,76 (s, 1,8H), 3,75 (s, 1,2H), 3,78-3,72 (m, 1H), 3,50-3,41 (m, 1H), 3,33-3,14 (m, 1H), 2,69-2,60 (m, 2H), 2,57-2,43 (m, 1H), 1,87-1,79 (m, 1H), 1,70-1,61 (m, 1H), 1,60-1,32 (m, 8H), 1,47 (s, 4,5H), 1,41 (s, 4,5H), 1,10 (dd, 6H), 0,99 (d, 3H)

Bước E: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua

1-(*Tert*-butyl) 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (34,0g, 82,8mmol) thu được ở bước D được hoà tan trong điclorometan (200ml), và dung dịch axit clohydric 1,4-đioxan 4N (82,8 ml, 331,3mmol) được bổ sung vào ở 0°C. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 6 giờ, dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô (28,7g, 99%), nó được sử dụng luôn ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

MS $[M+H] = 311 (M+1)$

Ví dụ điều chế 2: Điều chế axit (3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carboxylic



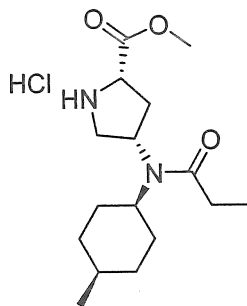
Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra theo phương pháp đã được mô tả trong Công bố đơn quốc tế No. WO 2004/092126.

MS $[M+H] = 282 (M+1)$

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,43-7,33 (m, 4H), 3,90-3,69 (m, 3H), 3,59 (dd, $J = 11,2, 10,0$ Hz, 1H), 3,29 (dd, $J = 11,2, 11,2$ Hz, 1H), 3,18-3,09 (m, 1H),

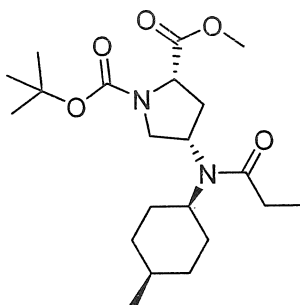
1,44 (s, 9H)

Ví dụ điều chế 3: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua



Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra thông qua các bước A và B.

Bước A: Điều chế 1-(*tert*-butyl) 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat

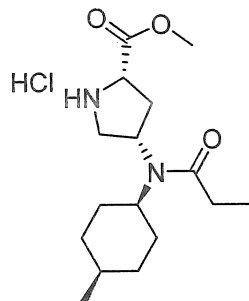


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,98g, 84 %) được tạo ra theo cách giống như ở bước D trong Ví dụ điều chế 1 bằng cách sử dụng 1-(*tert*-butyl) 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-(((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)amino)pyrrolidin-1,2-dicarboxylat (1,0g, 2,9mmol) thu được ở bước C của Ví dụ điều chế 1 và propionyl clorua (0,33g, 3,5mmol).

MS [M+Na] = 419,5 (M+23)

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 4,33 (m, 1H), 4,00-3,80 (m, 2H), 3,75 (m, 3H), 3,58 (m, 1H), 3,47 (m, 1H), 2,85-2,68 (m, 1H), 2,38 (q, 2H), 2,31 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 1,72-1,55 (m, 4H), 1,45 (m, 2H), 1,45-1,41 (m, 9H), 1,07 (m, 6H)

Bước B: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua

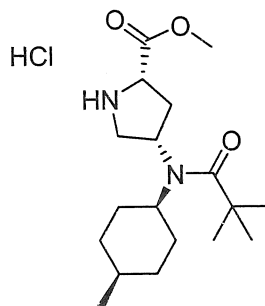


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,76g, 93%) được tạo ra theo cách giống như ở bước E của Ví dụ điều chế 1 bằng cách sử dụng 1-(*tert*-butyl) 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-1,2-đicarboxylat (0,98g, 2,4mmol) thu được ở bước A.

MS [M+H] = 297,4 (M+1)

¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,95 (brs, 1H), 8,63 (brs, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,53 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 2,53 (m, 1H), 2,37 (q, 2H), 2,24 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 1,68-1,55 (m, 4H), 1,52 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 0,97 (m, 6H)

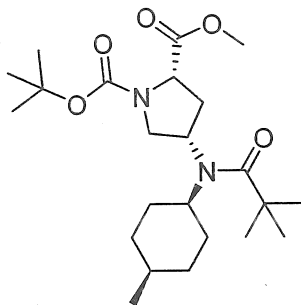
Ví dụ điều chế 4: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua



Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra thông qua các bước A và B.

Bước A: Điều chế 1-(*tert*-butyl) 2-methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-

methylxyclohexyl)pivalamido)pyrolidin-1,2-dicarboxylat

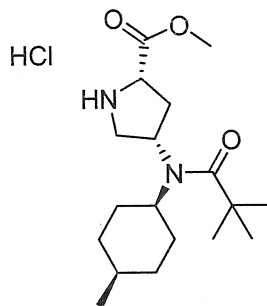


Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra theo phương pháp đã được mô tả trong Công bố đơn Quốc tế No. WO 2008/007930.

MS [M+Na] = 447,5 (M+23)

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 4,34 (m, 1H), 3,90-3,75 (m, 2H), 3,73 (m, 3H), 3,45 (m, 2H), 2,75-2,60 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 1,85 (m, 2H), 1,66 (m, 4H), 1,50 (m, 2H), 1,45-1,41 (m, 9H), 1,25-1,20 (m, 9H), 1,05 (d, 3H)

Bước B: Điều chế methyl (2S,4S)-4-(N-((1S,4R)-4-methylxyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua

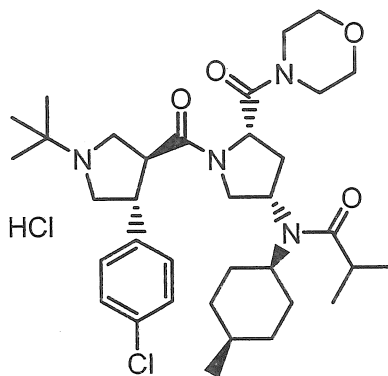


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,68g, 99%) được tạo ra theo cách giống như ở bước E của Ví dụ điều chế 1 bằng cách sử dụng 1-(*tert*-butyl) 2-methyl (2S,4S)-4-(N-((1S,4R)-4-methylxyclohexyl)pivalamido)pyrrolidine-1,2-dicarboxylat (0,80g, 1,88mmol) thu được ở bước A.

MS [M+H] = 325,4 (M+1)

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,24 (brs, 1H), 8,60 (brs, 1H), 4,41 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 3,77 (m, 3H), 3,40-3,28 (m, 3H), 2,55 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,70-1,50 (m, 6H), 1,40 (m, 2H), 1,21-1,10 (m, 9H), 1,00 (m, 3H)

Ví dụ 1: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramit hydroclorua



Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra thông qua các bước A, B, C và D.

Bước A: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylat

Methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua (28,7g, 82,73mmol) đã thu được ở Ví dụ điều chế 1, axit (3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carboxylic (24,5g, 86,87 mmol) đã thu được ở Ví dụ điều chế 2, 1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etyldiimit hydroclorua (22,2g, 115,83mmol), và 1-hydroxybenzotriazol hydrat (15,7g, 115,83mmol) được hoà tan trong *N,N'*-đimetylformamit (400ml), và *N,N'*-điisopropyletylamin (72,0ml, 413,66mmol) được bổ sung chậm vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ, dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm, sau đó dung dịch nước natri hydroxit 0,5N được bổ sung vào, và việc chiết được thực hiện hai lần bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch nước natri clorua và nước, được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm và được tinh chế bằng cách sắc ký trên cột để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (41,19g, 87%).

MS [M+H] = 575 (M+1)

Bước B: Điều chế axit (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylic

Metyl (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylat (39,4g, 68,62mmol) thu được ở bước A được hoà tan trong methanol (450ml), và dung dịch nước natri hydroxit 6*N* (57,2ml, 343,09mmol) được bổ sung vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ và điều chỉnh độ pH đến khoảng 5 bằng dung dịch nước axit clohydric 6*N*, dung dịch phản ứng này được cô đặc dưới áp suất giảm. Phần cô được hoà tan trong điclorometan, và sau đó chất rắn không hoà tan được lọc bằng giấy lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm để cho sản phẩm thô (38,4g, 99%), nó được sử dụng luôn ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

$$MS [M+H] = 561 (M+1)$$

Bước C: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramit

Axit (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramido)pyrrolidin-2-carboxylic (38,4g, 68,60mmol) thu được ở bước B, 1-(3-đimetylaminopropyl)-3-etylđiimit hydroclorua (18,4g, 96,04mmol), và 1-hydroxybenzotriazol hydrat (13,0g, 96,04mmol) được hoà tan trong *N,N'*-đimetylformamit (200ml), và morpholin (5,9 ml, 68,80mmol) và *N,N'*-điisopropyletylamin (59,7ml, 343,02mmol) được bổ sung chậm và lần lượt vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ, dung dịch phản ứng này được cô đặc dưới áp suất giảm, dung dịch nước natri hydroxit 0,5*N* được bổ sung vào, và việc chiết được thực hiện hai lần bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng dung dịch nước natri clorua và nước, được làm khô trên magie sulfat khan, và được lọc. Nước lọc được cô đặc dưới áp suất giảm và được tinh chế bằng cách sắc ký trên cột để thu được

hợp chất nêu ở đề mục này (37,05g, 86%).

$$\text{MS [M+H]} = 630 \text{ (M+1)}$$

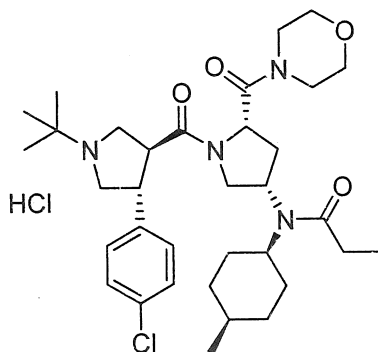
Bước D: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramit hydroclorua

N-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramit (5,0g, 7,95mmol) thu được ở bước C được hoà tan trong etyl axetat (50ml), và dung dịch axit clohydric etyl axetat 2N (3,97ml, 15,89mmol) được bổ sung chậm vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, dung môi phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm. Chất rắn thô thu được được tinh chế bằng cách nghiền bằng cách sử dụng hexan và dietyl ete để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (5,23g, 99%).

$$\text{MS [M+H]} = 630 \text{ (M+1)}$$

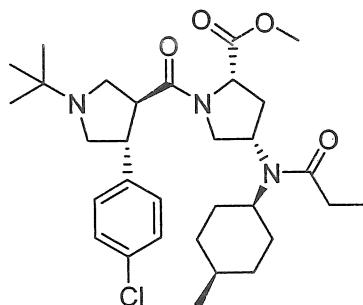
¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 7,49-7,44 (m, 4H), 4,83 (m, 1H), 4,23-4,20 (m, 1H), 3,95-3,91 (m, 2H), 3,79-3,47 (m, 14H), 3,03-3,00 (m, 1H), 2,86-2,82 (m, 1H), 2,73-2,67 (m, 1H), 2,20-2,14 (m, 1H), 1,97 (m, 1H), 1,80-1,62 (m, 5H), 1,50 (s, 9H), 1,44-1,27 (m, 3H), 1,06-1,04 (m, 9H)

Ví dụ 2: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxclohexyl)propionamit hydroclorua



Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra thông qua các bước A, B, C và D.

Bước A: Điều chế methyl (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylat

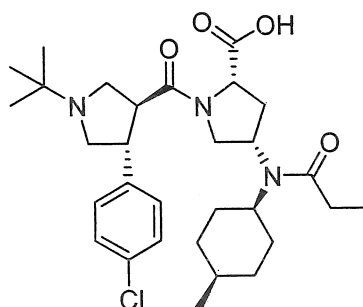


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,45g, 35 %) được tạo ra theo cách giống như ở bước A của ví dụ 1 bằng cách sử dụng methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua (0,76g, 2,28mmol) đã thu được ở Ví dụ điều chế 3 và axit (3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carboxylic (0,64g, 2,28mmol) đã thu được ở Ví dụ điều chế 2.

MS [M+H] = 560,4 (M+1)

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,39-7,30 (m, 4H), 4,45 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,65-3,35 (m, 6H), 3,13 (m, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 2,34 (q, 2H), 2,20 (m, 1H), 1,92 (m, 1H), 1,75-1,55 (m, 6H), 1,42 (m, 2H), 1,22 (m, 9H), 1,03 (m, 6H)

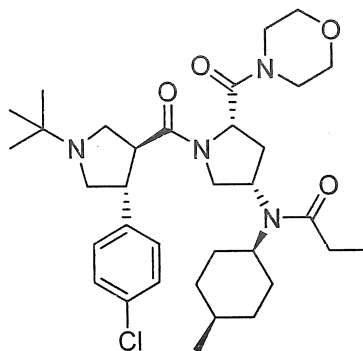
Bước B: Điều chế axit (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylic



Hợp chất nêu ở đề mục này (0,44g, 99%) được tạo ra theo cách giống như ở bước B của ví dụ 1 bằng cách sử dụng methyl (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylat (0,45g, 0,80mmol) thu được ở bước A.

$$\text{MS [M+H]} = 546,4 \text{ (M+1)}$$

Bước C: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamit

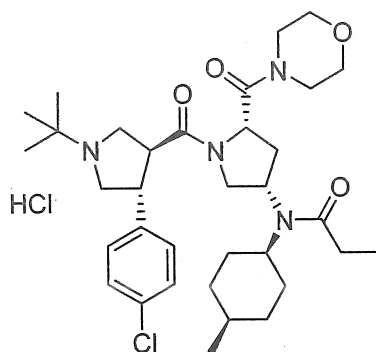


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,28g, 53%) được tạo ra theo cách giống như ở bước C của ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamido)pyrrolidin-2-carboxylic (0,44g, 0,80mmol) thu được ở bước B.

$$\text{MS [M+H]} = 615,5 \text{ (M+1)}$$

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 7,36 (m, 4H), 4,79 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,80-3,40 (m, 15H), 3,20 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,33 (q, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,71-1,56 (m, 6H), 1,40-1,20 (m, 11H), 1,00 (m, 6H)

Bước D: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamit hydroclorua

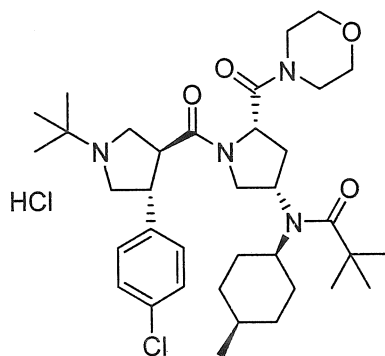


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,08g, 94 %) được tạo ra theo cách giống như ở bước D của ví dụ 1 bằng cách sử dụng *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)propionamit (0,08g, 0,13mmol) thu được ở bước C.

MS [M+H] = 615,5 (M+1)

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,43 (m, 4H), 4,82 (t, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,06-3,40 (m, 15H), 2,97 (m, 1H), 2,69 (m, 1H), 2,33 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,80-1,53 (m, 5H), 1,47 (s, 9H), 1,50-1,25 (m, 4H), 1,01 (m, 6H)

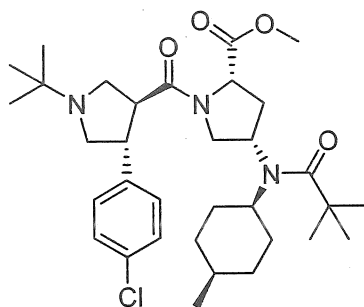
Ví dụ 3: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamit hydroclorua



Hợp chất nêu ở đề mục này được tạo ra thông qua các bước A, B, C và D.

Bước A: Điều chế metyl (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-

methylxyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylat

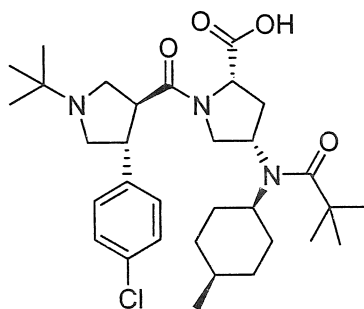


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,70g, 66 %) được tạo ra theo cách giống như ở bước A của ví dụ 1 bằng cách sử dụng methyl (2*S*,4*S*)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylat hydroclorua (0,65g, 1,8mmol) đã thu được ở Ví dụ điều chế 4 và axit (3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carboxylic (0,50g, 1,8mmol) đã thu được ở Ví dụ điều chế 2.

MS [M+H] = 588,5 (M+1)

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,40-7,30 (m, 4H), 4,49 (m, 1H), 4,00-3,50 (m, 4H), 3,71 (s, 3H), 3,40 (m, 3H), 3,20-3,05 (m, 2H), 3,00 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,73-1,60 (m, 6H), 1,60-1,35 (m, 2H), 1,25-1,17 (m, 18H), 1,01 (m, 3H)

Bước B: Điều chế axit (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylxyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylic

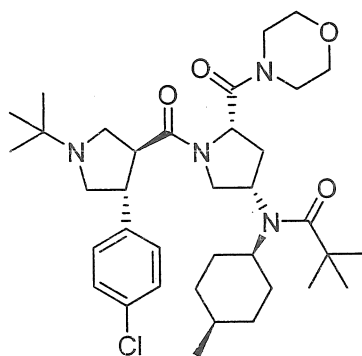


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,10g, 99%) được tạo ra theo cách giống như ở bước B của ví dụ 1 bằng cách sử dụng methyl (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-

4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylat (0,10g, 0,18mmol) thu được ở bước A.

$$\text{MS [M+H]} = 574,4 \text{ (M+1)}$$

Bước C: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamit

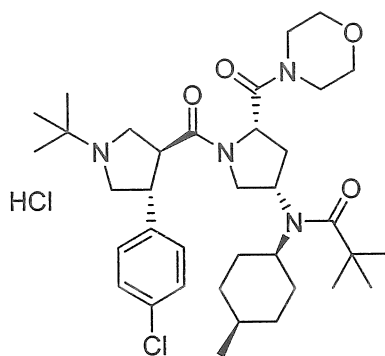


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,020g, 17%) được tạo ra theo cách giống như ở bước C của ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit (2*S*,4*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-4-(*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamido)pyrrolidin-2-carboxylic (0,10g, 0,18mmol) thu được ở bước B.

$$\text{MS [M+H]} = 643,5 \text{ (M+1)}$$

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 7,40-7,30 (m, 4H), 4,79 (m, 1H), 4,17 (m, 1H), 3,80-3,40 (m, 15H), 3,10 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,80-1,35 (m, 8H), 1,21-1,15 (m, 18H), 1,02 (m, 3H)

Bước D: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxcyclohexyl)pivalamit hydroclorua

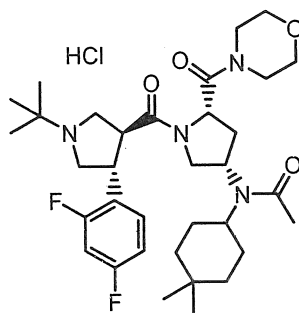


Hợp chất nêu ở đề mục này (0,29g, 83%) được tạo ra theo cách giống như ở bước D của ví dụ 1 bằng cách sử dụng *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-metylxclohexyl)pivalamit(0,33g, 0,51mmol) thu được ở bước C.

MS [M+H] = 643,5 (M+1)

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,41 (m, 4H), 4,80 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 3,80-3,40 (m, 13H), 2,94 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,11 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,15 (s, 9H), 1,45-1,30 (m, 3H), 1,01 (m, 3H)

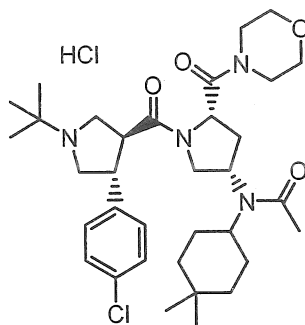
Ví dụ so sánh 1: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(2,4-điflorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(4,4-đimetylxclohexyl)axetamit hydroclorua (A95)



Hợp chất A95 của Công bố đơn Quốc tế No. WO 2008/007930 đã được tạo ra theo phương pháp giống như được mô tả trong đó.

Ví dụ so sánh 2: Điều chế *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-

clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(4,4-đimetylxyclohexyl)axetamit hydroclorua (A96)



Hợp chất A96 của Công bố đơn Quốc tế No. WO 2008/007930 đã được tạo ra theo phương pháp giống như được mô tả trong đó.

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm Luciferase

Để đánh giá khả năng chủ vận đối với MC4R (thụ thể melanocortin-4), dòng tế bào biểu hiện vĩnh viễn gen luciferase (CRE-LUC) dưới sự kiểm soát của MC4R và CRE (yếu tố đáp ứng cAMP) được thiết lập. Sau khi vector biểu hiện tế bào động vật có vú (pCDNA3 (Neo)) (Invitrogen) chứa gen MC4R được chuẩn bị, các dòng tế bào thận phôi thai người (HEK) được biến đổi bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen) cùng với vector (pCRE-Luc)(Stratagen) biểu hiện gen luciferase (CRE-LUC) dưới sự kiểm soát của yếu tố đáp ứng cAMP (CRE). Các dòng tế bào đã biến đổi (HEK MC4R-Luc) được ủ trong tủ ấm 37°C với sự có mặt của 5% CO₂ trong 24 giờ bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) chứa 10% huyết thanh bào thai bò đã được làm bất hoạt bằng nhiệt Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum (GIBCO/BRL). Các dòng tế bào này được ủ trong bốn ngày với sự có mặt của môi trường nuôi cấy tế bào Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) chứa 10ml môi trường chọn lọc (10% Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum (GIBCO/BRL), 100 đơn vị/ml penicillin (GIBCO/BRL), 100 đơn vị/ml streptomycin (GIBCO/BRL), 800 µg/ml Geneticin (G418) (GIBCO/BRL). Quá trình loại bỏ các tế bào đã bị chết do môi trường chọn lọc bằng cách thay thế môi trường này bằng 10ml môi trường chọn lọc mới được lặp lại ba lần, mỗi lần cách

nhau 4 ngày. Các khuẩn lạc riêng lẻ đã được hình thành bởi các dòng vô tính đã được chọn và nhân giống sau đó được chuyển dưới kính hiển vi vào đĩa nuôi cấy tế bào 24 lỗ chứa 1ml môi trường chọn lọc trong mỗi lỗ và được ủ trong 4 ngày. Forskolin (SIGMA) được xử lý với nồng độ cuối 10 μ M, và sau đó được ủ trong năm giờ trong tủ ấm 37°C với sự có mặt của 5% CO₂. Mỗi lỗ được xử lý bằng 50 μ l thuốc thử Bright-Glo luciferase (Promega) và giữ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và sau đó độ phát quang của mỗi lỗ được đo bằng cách sử dụng thiết bị đo quang sinh học (Victor). Các dòng vô tính có độ phát quang lớn hơn 100 lần hoặc hơn nữa so với giá trị nền bằng cách xử lý bằng Forskolin được chọn và được sử dụng để đánh giá khả năng chủ vận của từng hợp chất.

Các tế bào HEK MC4R-Luc được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ của thiết bị đo quang sinh học (Costar) với mức $2,5 \times 10^4$ tế bào trong 100 μ l môi trường nuôi cấy và sau đó được ủ trong tủ ấm 37°C với sự có mặt của 6% CO₂ trong 18 giờ. Chất chủ vận MCR đã pha loãng với mỗi bậc nồng độ bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy nêu trên được xử lý sao cho nồng độ DMSO cuối không vượt quá mức 1%, và sau đó được ủ trong năm giờ trong tủ ấm 37°C với sự có mặt của 6% CO₂. Mỗi lỗ được xử lý bằng 50 μ l thuốc thử Bright-Glo luciferase (Promega) và để ở nhiệt độ trong phòng trong năm phút, và sau đó độ phát quang của mỗi lỗ được đo bằng cách sử dụng thiết bị đo quang sinh học (Victor). Lượng phát quang do chất chủ vận đã được pha loãng với mỗi bậc nồng độ gây ra được quy đổi thành giá trị % tương đối so với lượng được biểu hiện bởi việc xử lý bằng 10 μ M NDP- α -MSH. EC_{0,5} MSH được biểu thị bằng nồng độ mà gây ra 50% lượng phát quang tối đa mà có thể được tạo ra bởi NDP- α -MSH và EC₅₀ được biểu thị bằng nồng độ mà gây ra 50% lượng phát quang tối đa có thể được tạo ra bởi mỗi chất chủ vận. Các số đo được xác định bằng phần mềm thống kê (Prizm).

Bảng 1 thể hiện các kết quả xác định khả năng chủ vận của MC4R của mỗi hợp chất đã thu được bởi các thử nghiệm nêu trên tính theo đơn vị EC₅₀ (nM).

Bảng 1

Thử nghiệm Luciferase, EC ₅₀ (nM)	
Hợp chất	MC4R

Ví dụ 1	0,562
Ví dụ 2	1,073
Ví dụ 3	0,675
Ví dụ so sánh 1 (A95)	17,45
Ví dụ so sánh 2 (A96)	5,479

Như được thể hiện trong Bảng 1, điều đã được xác nhận là, nằm trong số các các thụ thể melanocortin in vivo đã biết, đối với thụ thể melanocortin-4 (MC4R) liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng và sự kiểm soát cân nặng in vivo, các hợp chất của các ví dụ theo sáng chế có khả năng chủ vận MC4R rất tốt so với các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96).

Ví dụ thử nghiệm 2: thử nghiệm cAMP

Thụ thể melanocortin là một loại thụ thể bắt cặp với G protein (GPCR), và vai trò chính của G-protein là để kích hoạt các chất dẫn truyền thứ cấp để điều chỉnh các đáp ứng của tế bào đối với nhiều kích thích sinh lý thông qua quá trình truyền tín hiệu. MC4R là một thụ thể bắt cặp với Gs và đã biết rằng nếu MC4R có tương tác với một chất chủ vận, adenylat cyclaza (AC) sẽ được kích hoạt để làm tăng nồng độ AMP vòng (cAMP), mà là một trong số các chất dẫn truyền thứ cấp trong tế bào. Do đó, có thể đánh giá hoạt tính của các thụ thể melanocortin bằng cách đo mức độ tạo ra tín hiệu cAMP.

Sau khi các dòng tế bào đã bắt cặp với Gs cAMP Hunter (dòng tế bào CHO-K1) trồng đó mỗi thụ thể MC1R, MC3R, MC4R và MC5R đã được biểu hiện quá mức được thiết lập để có thể đo được mức gia tăng về mức cAMP trong các tế bào do phản ứng chủ vận, các tế bào này được cấy vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy bạch cầu và được ủ trong 24 giờ trong tủ ấm 37°C với sự có mặt của 5% CO₂. Sau khi ủ, môi trường được tách ra, và 15µl thuốc thử 2:1 HBBS/10mM HEPES:cAMP XS+Ab được bổ sung vào. Sau khi 5µl mẫu đã được pha loãng 4 lần bằng chất đệm được bổ sung vào, nồng độ chất dẫn thuốc được thiết lập ở mức 1%, và hợp chất chủ vận MC4R đã được pha loãng với mỗi bậc nồng độ được bổ sung vào, trước khi để phản ứng ở 37°C trong 30 phút. Hoạt tính (%) của mỗi hợp

chất chủ vận được biểu hiện theo giá trị $100\% \times (\text{giá trị RLU trung bình của mẫu} - \text{giá trị RLU trung bình của đối chứng giả dược}) / (\text{giá trị RLU trung bình của đối chứng tối đa} - \text{giá trị RLU trung bình của đối chứng giả dược})$, và giá trị này được phân tích bởi bộ phân tích dữ liệu CBIS (ChemInnovation, CA).

Bảng 2 thể hiện các kết quả đánh giá khả năng chủ vận của các thụ thể melanocortin của các hợp chất đã thu được từ các thử nghiệm nêu trên tính theo đơn vị EC_{50} (nM).

Bảng 2

Thử nghiệm cAMP, EC_{50} (nM)	
Hợp chất	MC4R
Ví dụ 1	36,5
Ví dụ 2	50,3
Ví dụ 3	22,7
Ví dụ so sánh 1 (A95)	335,3
Ví dụ so sánh 2 (A96)	150,0

Như được thể hiện trong Bảng 2, điều đã được xác nhận là, nằm trong số các thụ thể melanocortin in vivo đã biết, đối với thụ thể melanocortin-4 (MC4R) liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng và sự kiểm soát cân nặng in vivo, các hợp chất của các ví dụ theo sáng chế có khả năng chủ vận của thụ thể rất tốt so với các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96).

Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm β -arrestin

Thụ thể melanocortin là một loại thụ thể bắt cặp với G protein (GPCR) và điều chỉnh các phản ứng sinh lý khác nhau bằng cách truyền tín hiệu từ nhiều chất dẫn truyền thần kinh. Khi GPCR được phosphoryl hóa, β -arrestin được gắn kết với phần đã phosphoryl hóa của thụ thể và đóng một vai trò quan trọng trong việc kích hoạt các đường tín hiệu khác nhau trong tế bào thông qua sự tương tác với các protein khác. Đã biết rằng, khi thụ thể melanocortin tương tác với một chất chủ vận, β -arrestin sẽ được huy động và tham gia vào đường truyền tín hiệu qua trung gian β -arrestin. Do đó, hoạt tính của thụ thể melanocortin có thể được đánh

giá thông qua số đo β -arrestin.

Dòng tế bào Pathhunter eXpress β -arrestin (dòng tế bào U2OS) trong đó MC1R, MC3R, MC4R, MC5R đã hướng đích Prolink (PK) và β -arrestin đã hướng đích thụ thể enzyme (EA) đã được biểu hiện cùng nhau được thiết lập. Khi phần MCR-PK của dòng tế bào này được hoạt hoá, β -arrestin-EA được huy động, và thụ thể enzyme (EA) và Prolink (PK), là các đoạn enzyme β -galactosidaza, tương tác. Enzyme đã kích hoạt này thuỷ phân cơ chất bởi hoạt tính β -galactosidaza để tạo ra tín hiệu hoá phát quang, nhờ đó có thể đo được hoạt tính. Sau khi dòng tế bào Pathhunter eXpress β -arrestin (dòng tế bào U2OS) được ủ, các tế bào được cấy vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy tế bào và được ủ trong 48 giờ trong tủ ấm 37°C với sự có mặt của 5% CO₂. Sau khi ủ, 5 μ l mẫu đã được pha loãng 5 lần bằng chất đệm được bổ sung vào, nồng độ chất dẫn thuốc được thiết lập ở mức 1%, và hợp chất chủ vận MC4R đã được pha loãng với mỗi bậc nồng độ được bổ sung vào, trước khi để phản ứng ở 37°C trong 90 phút. Hoạt tính (%) của mỗi hợp chất chủ vận được biểu hiện theo giá trị 100% x (giá trị RLU trung bình của mẫu – giá trị RLU trung bình của đối chứng giả dược) / (giá trị RLU trung bình của đối chứng tối đa – giá trị RLU trung bình của đối chứng giả dược), và giá trị này được phân tích bởi bộ phân tích dữ liệu CBIS (ChemInnovation, CA).

Bảng 3 thể hiện các kết quả đánh giá khả năng hoạt tính của thụ thể melanocortin của mỗi hợp chất đã thu được từ các thử nghiệm nêu trên tính theo đơn vị EC₅₀ (nM).

Bảng 3

Thử nghiệm β -arrestin, EC ₅₀ (nM)	
Hợp chất	MC4R
Ví dụ 1	4,6
Ví dụ 2	8,7
Ví dụ 3	3,3
Ví dụ so sánh 1 (A95)	176,4
Ví dụ so sánh 2 (A96)	44,3

Như được thể hiện trong Bảng 3, điều đã được xác nhận là, nằm trong số

các thụ thể melanocortin in vivo đã biết, đối với thụ thể melanocortin-4 (MC4R) liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng và sự kiểm soát cân nặng in vivo, các hợp chất của các ví dụ theo sáng chế có khả năng chủ vận của thụ thể rất tốt so với các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96).

Ví dụ thử nghiệm 4: ái lực gắn kết

Đã biết năm phân nhóm thụ thể melanocortin (MCR) in vivo, và đã biết rằng MC4R, là phân nhóm 4, có liên quan tới quá trình chuyển hóa năng lượng và sự kiểm soát cân nặng. Do các phân nhóm MCR khác có liên quan đến việc điều chỉnh các chức năng khác nhau in vivo như sắc tố da, sự cân bằng nội môi năng lượng và chức năng ngoại tiết, nên việc đảm bảo tính chọn lọc đối với MC4R của các hợp chất chủ vận MC4R là rất quan trọng trong việc ngăn ngừa các tác dụng phụ có thể xảy ra trong tương lai. Do đó, khả năng gắn kết thụ thể của các chất chủ vận MC4R đối với mỗi phân nhóm MCR đã được đánh giá.

Sau khi dòng tế bào CHO-K1 biểu hiện MC1R tái tổ hợp của người và các dòng tế bào HEK-293 biểu hiện MC3R, MC4R và MC5R đã được thiết lập, các màng được thu thập đối với từng dòng tế bào. Trong đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ, 3 μ g màng MC1R và 0,04 nM 125 I-NDP- α -MSH cho mỗi lỗ được cho phản ứng ở 37°C trong hai giờ. 3 μ g màng MC3R và MC5R và 0,035nM 125 I-NDP- α -MSH được cho phản ứng ở 37°C trong một giờ, và 3,12 μ g màng MC4R và 0,02 nM 125 I-NDP- α -MSH được cho phản ứng ở 37°C trong hai giờ. Tại thời điểm này, chất đệm hấp phụ 25mM HEPES-KOH (độ pH = 7,0) chứa chất chủ vận MCR đã được pha loãng với mỗi bậc nồng độ được bổ sung vào mỗi lỗ và được cho phản ứng. Dung dịch đã phản ứng này được chuyển vào bộ lọc và được rửa bằng chất đệm hấp phụ, và sau đó đo độ phóng xạ. Giá trị không bao gồm lượng gắn kết không đặc hiệu với sự có mặt của 1 μ M (MC1R) và 3 μ M (MC3R, MC4R, MC5R) của NDP- α -MSH từ mỗi tổng lượng gắn kết được sử dụng làm lượng gắn kết đặc hiệu của 125 I-NDP- α -MSH. Mức độ gắn mà gắn kết đặc hiệu 125 I-NDP- α -MSH bị ức chế bởi chất chủ vận được pha loãng với mỗi bậc nồng độ được đo. IC₅₀ được biểu thị dưới dạng nồng độ của mỗi chất chủ vận ức chế sự gắn kết đặc hiệu của 50% 125 I-NDP- α -MSH.

Bảng 4 thể hiện các kết quả đo mức độ gắn kết của các thụ thể melanocortin của các hợp chất đã thu được từ các thử nghiệm nêu trên tính theo đơn vị Ki (nM).

Bảng 4

Ái lực gắn kết, Ki (nM)	
Hợp chất	MC4R
Ví dụ 1	65
Ví dụ 2	110
Ví dụ 3	24
Ví dụ so sánh 1 (A95)	1400
Ví dụ so sánh 2 (A96)	360

Như được thể hiện trong Bảng 4, điều đã được xác nhận là, nằm trong số các thụ thể melanocortin in vivo đã biết, đối với thụ thể melanocortin-4 (MC4R) liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng và sự kiểm soát cân nặng in vivo, các hợp chất của các ví dụ theo sáng chế có khả năng gắn kết thụ thể rất tốt so với các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96).

Ví dụ thử nghiệm 5: Dược động học và sự chuyển hoá thuốc

Ví dụ thử nghiệm 5-1: Kiểu dược động học

Để khảo sát các đặc tính dược động học (PK) của hợp chất của ví dụ 1 và các hợp chất của các ví dụ so sánh, thử nghiệm sau đã được thực hiện.

Để thực hiện thử nghiệm PK đối với hợp chất của ví dụ 1 và các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96), chuột C57BL6 khoảng 7 tuần tuổi đã được chuẩn bị, 12 con được chỉ định cho mỗi chất được sử dụng, được chia thành các nhóm, và bỏ đói không cho ăn. Vào ngày dùng thuốc, dung dịch thuốc được chuẩn bị với nồng độ 1mg/mL bằng cách sử dụng nước cất (DW) làm chất dẫn thuốc và được cho dùng qua đường miệng với liều lượng 1ml cho mỗi kg thể trọng của mỗi cá thể và liều dùng cuối là 10mg/kg. Tại thời điểm 1, 3, 8 và 24 giờ sau dùng thuốc, máu toàn phần được thu thập thông qua việc lấy máu tim từ 3 cá thể trong mỗi nhóm và sau đó được để trong ống heparin để tránh đông máu. Sau đó, đại

não của mỗi cá thể được thu thập và đặt trong ống EP, trọng lượng của mô được đo và việc bảo quản đông lạnh được thực hiện ở -20°C .

Vào ngày phân tích, DDW với lượng gấp 4 lần khối lượng mô được thêm vào mỗi ống mô và được làm đồng nhất, và huyết tương đã lưu trữ được rã đông ở nhiệt độ trong phòng. Cũng như với huyết tương, 50 μL dịch treo mô đồng thể được lấy và chuyển sang một ống riêng biệt, và sau đó 200 μL axetonitril (AN), với lượng gấp 4 lần tổng thể tích mẫu, được thêm vào mỗi ống huyết tương và dịch treo mô đồng thể để thực hiện quá trình khử protein. Trong trường hợp này, AN đã bao gồm một chuẩn nội. Để xây dựng đường chuẩn, dung dịch AN (cùng với chất chuẩn nội IS) với các nồng độ đã biết 0,1, 0,5, 5, 50, và 500 ng/mL được chuẩn bị, và thực hiện quá trình khử protein với thể tích gấp 4 lần như trên trong huyết tương trống của từng huyết tương và não. Do đó, các đường chuẩn cuối từ 0,4 đến 2000ng/mL cho huyết tương và 1, 5, 50, 500 và 5000ng/mL cho não đã được chuẩn bị. Sau khi 0,5 μL dịch nổi bên trên đã thu được sau quá trình khử protein được tiêm vào LC-MS/MS, các diện tích pic của các hợp chất của ví dụ và các ví dụ so sánh (A95 và A96) được hiệu chỉnh bằng các diện tích pic của IS để thu được đáp ứng đỉnh tại mỗi điểm thu mẫu và thực hiện việc quy đổi nồng độ bằng đường chuẩn.

Các thông số dược động học (C_{max} , AUC_{inf} , $t_{1/2}$, và các thông số tương tự) được tính toán bằng phương pháp phân tích dược động học không ngăn bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin 8.1 cho các giá trị của nồng độ trong máu theo thời gian cho mỗi nhóm dùng thuốc.

Các đặc tính dược động học của mỗi hợp chất được so sánh bằng cách so sánh mức độ phơi nhiễm, thay đổi thời gian bán hủy và các chỉ số tương tự đối với từng nhóm sử dụng thuốc và giá trị thu được được thể hiện trong các Bảng 5 và 6. Ngoài ra, các giá trị kết quả theo tỷ lệ giữa mức phơi nhiễm với não và mức phơi nhiễm máu được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 5

Thông số	Huyết tương		
	Ví dụ 1	Ví dụ so sánh 1 (A95)	Ví dụ so sánh 2 (A96)
C_{max} (ng/ml)	232,3	205,0	337,1

AUC_{inf} (ng·giờ/mL)	2067,0	564,6	1654,5
$t_{1/2}$ (giờ)	3,9	2,7	2,6

Bảng 6

Thông số	Não		
	Ví dụ 1	Ví dụ so sánh 1 (A95)	Ví dụ so sánh 2 (A96)
C_{max} (ng/ml)	49,1	20	27,1
AUC_{inf} (ng·giờ/mL)	1495,3	222,1	529,6
$t_{1/2}$ (giờ)	19,0	6,0	8,0

Bảng 7

Tỷ lệ AUC giữa não và huyết tương			
Thông số	Ví dụ 1	Ví dụ so sánh 1 (A95)	Ví dụ so sánh 2 (A96)
	Tỷ lệ trung bình		
Giá trị	0,72	0,39	0,32

Từ các kết quả nêu trên, mức độ phơi nhiễm của từng hợp chất được xác nhận trong toàn bộ cơ thể và não theo thứ tự hợp chất của ví dụ 1, hợp chất của ví dụ so sánh 2 (A96) và hợp chất của Ví dụ so sánh 1. (A95). Thời gian bán hủy mất đi trong não trong thời gian quan sát cao hơn giá trị quan sát được trong máu, và dường như rằng điều này có nghĩa là sự lưu hiệu quả của một loạt các chất tại vị trí biểu hiện hiệu quả. Ngoài ra, điều đã được xác nhận là, khi mỗi hợp chất được sử dụng với cùng một liều lượng, hợp chất của ví dụ theo sáng chế có mức độ tồn lưu và phơi nhiễm tuyệt đối tốt nhất trong não. Ngoài ra, điều đã được xác nhận là tỷ lệ giữa độ phơi nhiễm trong não và độ phơi nhiễm trong máu của hợp chất của ví dụ 1 cũng là tốt nhất so với các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96).

Ngoài các kết quả này, khi hoạt tính in vitro của mỗi hợp chất và mức độ của thuốc được xem xét một cách toàn diện, hiệu quả tốt nhất có thể được mong đợi từ hợp chất của ví dụ 1 so với các hợp chất của các ví dụ so sánh, khi dùng

cùng một liều lượng. Để đạt được hiệu quả ở một mức độ cụ thể, có thể sử dụng liều dùng thấp hơn, và do đó, nó được mong đợi để giảm thiểu các tác dụng phụ do phơi nhiễm toàn thân.

Ví dụ thử nghiệm 5-2: Khả năng ức chế CYP (%)

Để xác nhận sự tương tác của thuốc đối với enzym CYP (cytochrome P450), thử nghiệm sau được thực hiện.

Để xác định và so sánh khả năng ức chế của hợp chất của ví dụ 1 và của hợp chất của ví dụ so sánh 2 (A96), các enzym tái tổ hợp CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, và 3A4 được chuẩn bị. Bảng 8 dưới đây mô tả việc sử dụng cơ chất dò, đối chứng dương, và isoenzym và các điều kiện đo để xác định khả năng ức chế của mỗi chất.

Bảng 8

Isoenzym CYP	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
Cơ chất dò	ER	FCA	BMC	MMC	7BQ
(nồng độ cuối)	0,5 μ M trong 1% axetonitril	50 μ M trong 1% axetonitril	10 μ M trong 1% DMSO	10 μ M trong 1% metanol	25 μ M trong 1% axetonitril
Đối chứng dương	Furafylline	Axit tienilic	Ticlopidine	Paroxetine	Troleandomycin
Nồng độ cuối dương tính (mg/mL)	0,01	0,1	0,0014	0,008	0,1
Bước sóng (nm) :kích thích/phát xạ	530/590	409/508	409/460	409/485	409/530

Việc ủ được thực hiện trong đĩa 96 lỗ (Costar, 3792-đen, đáy tròn), hệ thống đệm được sử dụng cho quá trình chuyển hóa gồm 50mM chất đệm kali photphat và độ pH = 7,4, và thể tích phản ứng cuối cùng là 250 μ L. Các nồng độ cuối của hợp chất của ví dụ 1, hợp chất của ví dụ 2 (A96) và đối chứng dương trong toàn bộ chất đệm là 10 μ M (2% metanol (thể tích/thể tích)), và mỗi chất đều bao gồm đối chứng âm (duy nhất metanol, 2% (thể tích/thể tích)). Chất đệm đã được bổ sung hợp chất thử nghiệm được trộn với cùng một thể tích của dung dịch

tạo isoenzym CYP sao cho nồng độ cuối cùng là 10 μ M, sau đó được làm ấm trước trong 10 phút trong máy đọc đĩa huỳnh quang 37°C. Mỗi dung dịch NRS trong lỗ (Hệ thống tái tạo NADPH: 0,22 mM β -NADP, 2,8mM glucoza-6-phosphat, và 0,6 đơn vị/mL của glucoza-6-phosphat dehydrogenaza) được bổ sung vào, tiếp theo là ủ sơ bộ trong 30 phút. Sau đó, phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm chất nền vào lỗ đã được ủ trước và theo dõi với khoảng thời gian cách nhau một phút ở bước sóng đo đối với mỗi chất nền trong 30 phút. Các giá trị đo thu được từ đối chứng dương và hợp chất của ví dụ 1 được so sánh với cường độ huỳnh quang của đối chứng âm (không ức chế hoặc không có hợp chất) để xác nhận khả năng ức chế của từng hợp chất đối với isoenzym. Khả năng ức chế (%) đối với mỗi isoenzym khi mỗi hợp chất được xử lý ở 10 μ M được thể hiện trong Bảng 9. Hoạt tính ức chế (%) được đánh giá dựa trên các tiêu chí sau: A = <50%, B => 50%.

Nồng độ xử lý 10 μ M của hợp chất là rất cao, và đây là một tiêu chí an toàn để đánh giá khả năng ức chế dựa trên nồng độ xử lý như vậy và chọn thuốc có tỷ lệ ức chế thấp hơn 50% làm đối tượng nghiên cứu. Có thể xem rằng ít có khả năng là thuốc nghiên cứu được chọn trong trường hợp ức chế isoenzym CYP.

Bảng 9

Isoenzym CYP	Khả năng ức chế CYP (%) ở 10 μ M				
	1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
Ví dụ 1	A	A	A	A	A
Ví dụ so sánh 2 (A96)	A	B	A	A	A

Từ các kết quả trên, khi được xử lý ở cùng nồng độ, điều đã được xác nhận là khả năng ức chế của hợp chất của ví dụ 1 đối với isoenzym CYP chính thấp hơn hoặc tương tự như khả năng ức chế của hợp chất (A96) của Ví dụ so sánh 2. Có vấn đề là Hợp chất (A96) của Ví dụ so sánh 2 có sự tương tác thuốc do khả năng ức chế rất cao đối với CYP2C9. CYP2C9 đã biết là có liên quan tới quá trình chuyển hóa của khoảng 10% trong số tất cả các loại thuốc bán trên thị trường và đóng một vai trò chính trong việc làm mất tác dụng của các thuốc có cửa sổ điều trị hẹp. Ngoài ra, CYP2C9 rất có ý nghĩa về cả khía cạnh nghiên cứu

lẫn khía cạnh lâm sàng do tính đa hình tùy thuộc vào từng cá thể được nghiên cứu. Điều này cũng có thể được biết từ thực tế là CYP2C9 được liệt kê nằm trong danh sách các isoenzym cơ bản mà hiệu quả ức chế cần phải được kiểm tra trong quá trình phát triển thuốc trong hướng dẫn sự tương tác thuốc-thuốc (DDI) của FDA.

Dựa trên điều đó, điều đã được xác định là khi sử dụng hợp chất của ví dụ 1, mức độ tương tác thuốc do sự ức chế CYP gây ra là thấp hơn so với ở hợp chất so sánh (A96)

Ví dụ thử nghiệm 6: Dược lý

Tác dụng dược lý của chất chủ vận thụ thể melanocortin-4 của hợp chất theo sáng chế được đánh giá trong mô hình bệnh béo phì sau đây.

Ví dụ thử nghiệm 6-1: Mô hình bệnh béo phì ở chuột do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra

Hiệu quả của các chất chủ vận thụ thể melanocortin-4 đối với bệnh béo phì được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình bệnh béo phì ở chuột do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra.

Chuột đực C57BL/6Ntaconic 5 tuần tuổi được cho ăn với chế độ ăn chất béo 60 kcal% (D12492, Research Diet.) trong 15 tuần để gây ra bệnh béo phì. Hợp chất của ví dụ 1, các hợp chất của các ví dụ so sánh (A95 và A96), và sibutramin làm đối chứng dương được điều chế trong nước cất và cho dùng qua đường miệng cho các mô hình chuột mắc bệnh béo phì 19 tuần tuổi do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra một lần mỗi ngày một lần từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 16. Từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 16, thể trọng được đo một lần một ngày, lượng ăn vào được đo năm lần một tuần, và lượng nước uống được đo hai lần một tuần. Lượng đường trong máu và hemoglobin glycosyl hoá được đo vào ngày thứ 15, và tất cả các con vật đều bị giết vào ngày thứ 17. Máu được lấy qua tĩnh mạch chủ bụng, và gan và các mô mỡ mào tinh được cắt bỏ và cân. Máu thu được được cho vào ống heparin và quay ly tâm để tách huyết tương, và sau đó việc phân tích sinh hóa huyết tương được thực hiện.

Bảng 10 thể hiện sự khác biệt về tỷ lệ thay đổi cân nặng so với chất dẫn

thuốc được đo vào ngày thứ 12 đối với mỗi liều lượng của mỗi hợp chất.

Bảng 10

Ngày thứ 12	10 mg/kg	30 mg/kg
Ví dụ 1	-9,4%*	-15,1%**
Ví dụ so sánh 1	-4,8%	-4,0%
Ví dụ so sánh 2	-0,2%	-7,1%
Sibutramine	-6,8%	NT (không thử nghiệm)

Sự thay đổi về tỷ lệ cân nặng so với chất dẫn thuốc

Sự khác nhau đáng kể về thể trọng giữa nhóm đối chứng dùng chất dẫn thuốc và nhóm được điều trị bằng hợp chất: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Trung bình $\pm$ SEM, Thử nghiệm T-test, không ghép đôi, hai đuôi)

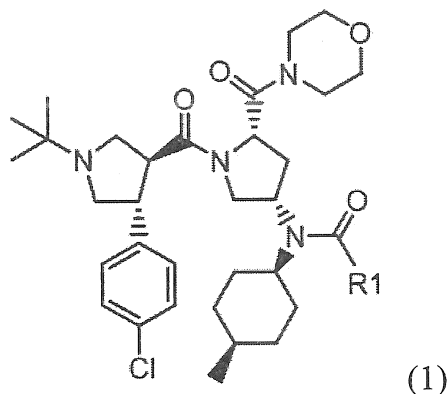
Ở mô hình chuột bệnh béo phì này, đặc biệt, khi chỉ sử dụng hợp chất của ví dụ 1, sự sụt cân đáng kể được thể hiện. Khi hợp chất của ví dụ 1 được sử dụng với liều dùng 10mg/kg và 30mg/kg, có được mức độ ức chế sự tăng cân lần lượt là -9,4% và -15,1% so với đối chứng chất dẫn thuốc sử dụng dung môi, và hiệu quả giảm cân có ý nghĩa thống kê được thể hiện so với các hợp chất của ví dụ so sánh (A95 và A96).

Điều này có được là do khả năng chủ vận MC4R trong ống nghiệm vượt trội, khả năng phơi nhiễm và độ tồn lưu tuyệt đối trong não vượt trội, và tỷ lệ phơi nhiễm trong não so với phơi nhiễm trong máu của hợp chất của ví dụ 1 rất tốt, so với các hợp chất của các ví dụ so sánh và nó được coi là một sự khác biệt đáng kể có thể được thể hiện ngay cả ở các liều dùng thấp.

Ngoài ra, hợp chất của ví dụ 1 cho các kết quả vượt trội tương đương hoặc cao hơn về hiệu quả so với Sibutramine (Reductil), là một chất điều trị bệnh béo phì trong lĩnh vực có liên quan, và do đó nó được kỳ vọng sẽ cho thấy hiệu quả đáng kể của thuốc trong ứng dụng lâm sàng thực tế.

Yêu cầu bảo hộ

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



trong đó R1 là C₂-C₅ alkyl;

và trong đó chất đồng phân bao gồm chất đồng phân cis hoặc trans, chất đồng phân R hoặc S, chất triệt quang, hoặc chất đồng phân lập thể.

2. Hợp chất theo điểm 1, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó R1 là C₂-C₄ alkyl.

3. Hợp chất theo điểm 2, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó R1 là etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl or tert-butyl.

4. Hợp chất theo điểm 2, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm hợp chất sau:

N-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylcyclohexyl)isobutyramit;

N-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylcyclohexyl)propionamit;
và

N-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*S*,4*R*)-4-methylcyclohexyl)pivalamit.

5. Hợp chất theo điểm 4, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất này là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxclohexyl)isobutyramit.
6. Hợp chất theo điểm 4, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất này là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxclohexyl)propionamit.
7. Hợp chất theo điểm 4, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất này là *N*-((3*S*,5*S*)-1-((3*S*,4*R*)-1-(*tert*-butyl)-4-(4-clorophenyl)pyrrolidin-3-carbonyl)-5-(morpholin-4-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-((1*s*,4*R*)-4-metylxclohexyl)pivalamit.
8. Hợp chất theo điểm 1, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó muối được dụng được chọn từ nhóm chỉ gồm axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, axit bromhydric và axit iodohydric.
9. Hợp chất theo điểm 8, hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó, trong đó muối được dụng là hydroclorua.
10. Dược phẩm có tính chủ vận đối với thụ thể melanocortin chứa hợp chất có công thức (1), hoặc chất đồng phân hoặc muối được dụng của nó như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 9 làm hoạt chất, cùng với chất mang được dụng.