



(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) 

1-0019652

(51)⁷ **C07D 239/47, A61K 31/505, A61P**
13/08, 13/12, 17/06, 19/10, 25/28,
27/02, 29/00, 3/06, 31/12, 33/00, 35/00,
43/00, 9/10

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|---------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2012-03899 | (22) | 03.06.2011 | | |
| (86) | PCT/JP2011/062751 | 03.06.2011 | (87) | WO2011/152508 | 08.12.2011 |
| (30) | 2010-128585 | 04.06.2010 JP | | | |
| | 2010-218299 | 29.09.2010 JP | | | |
| (45) | 27.08.2018 | 365 | (43) | 25.03.2013 | 300 |
| (73) | KOWA COMPANY, LTD. (JP)
6-29, Nishiki 3-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-8625, Japan | | | | |
| (72) | OHGIYA Tadaaki (JP), MURAKAMI Takeshi (JP), MIYOSAWA Katsutoshi (JP),
SHIBUYA Kimiyuki (JP), YAMAZAKI Koichi (JP), KUSAKABE Taichi (JP) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD) | | | | |
-

(54) **HỢP CHẤT DIBENZYLAMIN QUAY QUANG, DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl](ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic gần như tinh khiết về mặt quang học, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, mà có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và làm tăng lượng thụ thể LDL.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất dibenzylamin quay quang hữu dụng làm hoạt chất trong dược phẩm hoặc sản phẩm tương tự, và phương pháp điều chế hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong những năm gần đây, bệnh nhân bị bệnh rối loạn lipit máu (tăng lipit máu) và bệnh xơ cứng động mạch do bệnh này gây ra ngày càng tăng do các thay đổi trong thói quen ăn uống dùng các loại thực phẩm có lượng calo cao và thực phẩm giàu cholesterol kèm theo sự cải thiện tiêu chuẩn sống, bệnh béo phì, thiếu luyện tập, sự hóa già, và tình trạng tương tự. Nhiều nghiên cứu nguyên nhân bệnh bao gồm nghiên cứu Framingham đã cho thấy rằng lượng cholesterol lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein-LDL) có liên quan tích cực đến tốc độ khởi phát bệnh tim. Do đó, các liệu pháp thuốc điều trị chứng rối loạn lipit máu và xơ cứng động mạch đặc biệt tập trung vào việc làm giảm trị số cholesterol LDL (tài liệu không patent 1).

Đối với tình trạng tăng cholesterol LDL huyết, mà là một trong số các yếu tố nguy cơ lớn gây ra bệnh tim mạch, các phương pháp điều trị đã được phát triển đáng kể bằng cách đưa ra chất ức chế HMG-CoA reductaza (statin). Tuy nhiên, mặc dù statin làm giảm hiệu quả lượng cholesterol LDL, làm giảm tỷ lệ mắc bệnh tim và tỷ lệ chết do bệnh tim mạch vẫn còn cao khoảng 30%. Được cho rằng có thể làm giảm nguy cơ tử vong do bệnh tim mạch bằng cách làm giảm lượng cholesterol LDL. Tuy nhiên, không thể dùng liều cao statin do nguy

cơ tiêu cơ vận ngày càng gia tăng.

Do đó, thuốc mà có tác dụng làm giảm hiệu quả lượng cholesterol LDL trong máu là mong muốn và được dựa trên cách tác dụng khác với cách tác dụng của statin.

Tiền protein convertaza (proprotein convertase-PC) là các thành viên thuộc họ serin proteaza của động vật có vú, trong đó tính tương đồng với subtilisin ở vi khuẩn và kexin ở nấm men đã được quan sát. Một trong số các PC, PCSK9 (tiền protein convertaza subtilisin/kexin 9), chủ yếu được biểu hiện ở gan và được tiết ngoại bào, và sau đó được gắn kết với thụ thể LDL trên bề mặt màng tế bào của các tế bào gan để thúc đẩy sự di chuyển của thụ thể LDL vào tế bào. Thụ thể LDL di chuyển vào tế bào bị phân hủy bởi các cơ quan tế bào. Vì thụ thể LDL có chức năng vận chuyển lipoprotein chứa cholesterol LDL trong máu đến gan, nên việc tổng hợp protein PCSK9 ức chế sự hấp thu cholesterol LDL trong máu vào gan, dẫn đến làm tăng lượng cholesterol LDL trong máu. Thực tế là, đã biết rằng lượng cholesterol LDL trong máu là cao ở người có đột biến loại thu được chức năng ở gen PCSK9, mà có liên quan đến tình trạng tăng cholesterol huyết chủ yếu trên nhiễm sắc thể thường (tài liệu không patent 2). Trong khi đó, lượng cholesterol LDL trong máu thấp được duy trì ở người có đột biến loại mất chức năng ở gen PCSK9 (tài liệu không patent 3). Ngoài ra, đã được chứng minh rằng lượng cholesterol LDL là thấp ở chuột bị thiếu hụt gen PCSK9 ở gan (tài liệu không patent 4).

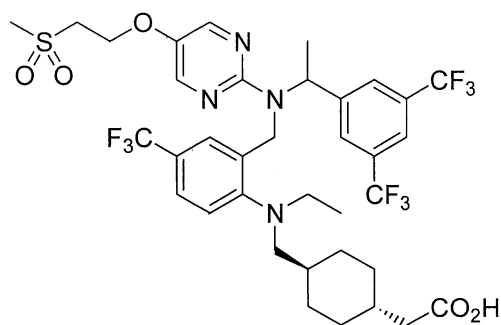
Từ các lý do nêu trên có thể cho rằng việc làm giảm lượng protein PCSK9 bằng cách ức chế sự tổng hợp protein này hoặc ức chế chống lại chức năng của protein PCSK9 dẫn đến làm tăng lượng thụ thể LDL, và do đó tạo ra

tác dụng làm giảm lượng cholesterol LDL có hiệu quả.

Trong các trường hợp này, các nghiên cứu tích cực về việc ức chế chức năng của protein PCSK9 hoặc ức chế tổng hợp chúng gần đây đã được tiến hành. Ví dụ, như các nghiên cứu sử dụng kháng thể hoặc oligonucleotit đối nghĩa, ức chế chức năng của protein PCSK9 nhờ kháng thể đơn dòng kháng PCSK9, ức chế sự tổng hợp protein PCSK9 dựa trên ARN can thiệp, và nghiên cứu tương tự đã được thông báo (tài liệu không patent 5 đến 7). Ngoài ra, vì các nghiên cứu sử dụng hợp chất có khối lượng phân tử thấp, đã được thông báo rằng berberin làm giảm lượng ARN thông tin và lượng protein PCSK9 ở các tế bào HepG2 (tài liệu không patent 8), và 5-azaxytidin, mà là chất hoạt hóa annexin A2, thúc đẩy sự gắn kết protein PCSK9 với annexin A2 và ức chế sự phân hủy thụ thể LDL (tài liệu patent 1). Tuy nhiên, hầu như không có hợp chất có khối lượng phân tử thấp nào được thông báo là các chất ức chế chống lại chức năng của protein PCSK9 hoặc các chất ức chế chống lại sự tổng hợp protein PCSK9 ngoại trừ các hợp chất được nêu trên.

Tài liệu patent 2 mô tả các hợp chất pyrimidin có cấu trúc dibenzylamin, mà có hoạt tính ức chế hiệu quả chống lại protein vận chuyển este cholesteryl (cholesteryl ester transfer protein-CETP), và cũng có tác dụng làm tăng lượng cholesterol HDL trong máu hiệu quả. Tài liệu này mô tả hợp chất có công thức (I) dưới đây ở dạng raxemat trong ví dụ 45:

[công thức 1]



(1)

Axit (trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethyl)amino)methyl]cyclohexyl}acetic, dưới đây cũng được dùng để chỉ là "hợp chất raxemat có công thức (I)" trong bản mô tả). Tuy nhiên, mối quan hệ bất kỳ giữa hợp chất raxemat có công thức (I) và protein PCSK9 không được mô tả hoặc đề xuất.

Vì các PC có ảnh hưởng đến sự tăng sinh, sự di chuyển, sự bám dính và sự xâm lấn của các tế bào ung thư, nên chúng được coi là đích để điều trị bệnh ung thư (tài liệu không patent 9). Mối quan hệ giữa PC với bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, và bệnh Alzheimer và mối liên quan giữa PC với các bệnh như bệnh truyền nhiễm do virus bao gồm hội chứng gây suy giảm miễn dịch mắc phải (acquired immunodeficiency syndrome-AIDS) và hội chứng hô hấp cấp tính nặng (severe acute respiratory syndrome-SARS) (tài liệu không patent 10 và 11) cũng đã được biết đến.

Do đó, việc dùng hợp chất có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 hoặc tác dụng ức chế chống lại chức năng của protein PCSK9 làm hoạt chất trong dược phẩm để điều trị các bệnh nêu trên cũng được kỳ vọng.

Tài liệu tham khảo đối với giải pháp kỹ thuật đã biết

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Công bố patent quốc tế WO2009/143633

Tài liệu patent 2: Công bố patent quốc tế WO2008/129951

Tài liệu không patent

Tài liệu không patent 1: Nippon Rinsho, Vol. 59, Extra issue 3, Hyperlipidemia (vol. 2), 381-386(2001)

Tài liệu không patent 2: Nat.Genet., 34, 154-156(2003)

Tài liệu không patent 3: N.Engl.J.Med., 354, 1264-1272(2006)

Tài liệu không patent 4: Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 102, 5374-5379(2005)

Tài liệu không patent 5: Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 106, 9820-9825(2009)

Tài liệu không patent 6: J.Lipid Res., 48, 763-767(2007)

Tài liệu không patent 7: Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 105, 11915-11920(2008)

Tài liệu không patent 8: Atherosclerosis, 201 (2), 266-73(2008)

Tài liệu không patent 9: Mol.Carcinogen., 44 (3), 151-161(2005)

Tài liệu không patent 10: J.Mol.Med., 83, 842-843(2005)

Tài liệu không patent 11: J.Mol.Med., 83, 844-855(2005)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích đạt được bởi sáng chế

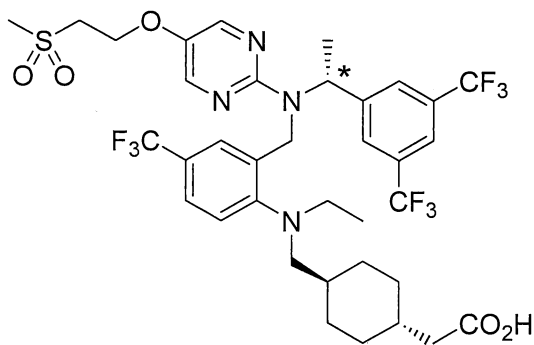
Mục đích của sáng chế là tạo ra hợp chất có khối lượng phân tử thấp có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và làm tăng lượng thụ thể LDL, và thuốc chứa hợp chất có khối lượng phân tử thấp này làm hoạt chất.

Biện pháp đạt được mục đích

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nhiều nghiên cứu khác nhau để đạt được mục đích nêu trên. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng hợp chất raxemat có công thức (I) và một trong số các chất đồng phân đối ảnh của nó,

axit (R)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflormetyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflormetyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic được thể hiện bởi công thức (II) dưới đây (dưới đây cũng được dùng để chỉ là "hợp chất đồng phân-(R) có công thức (II) "trong bản mô tả):

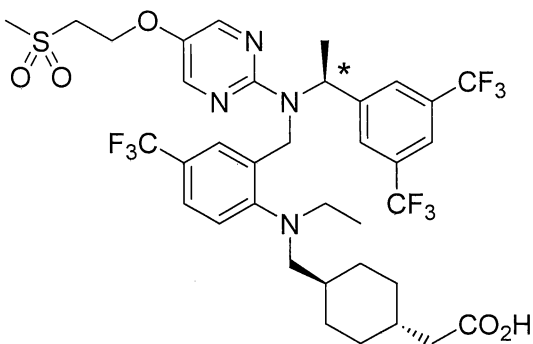
[công thức 2]



(II)

hầu như không có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL, đồng thời các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflormetyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflormetyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic quay trái được thể hiện bởi công thức (III) dưới đây (dưới đây cũng được dùng để chỉ là "hợp chất chất đồng phân-(S) có công thức (III)" trong bản mô tả):

[Công thức 3]



(III)

hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và làm tăng lượng thụ thể LDL một cách hiệu quả. Sáng chế được xây dựng trên cơ sở các phát hiện trên đây.

Sáng chế đề xuất axit (S)-trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5-$
 $\text{bis(triflometyl)phenyl]etyl}\}\{5-[2-(\text{metylsulfonyl})\text{etoxy}]pyrimidin-2-$
 $\text{yl}\}\text{amino})\text{metyl}]-4-(\text{triflometyl)phenyl}\}(\text{etyl})\text{amino})\text{metyl}]xyclohexyl\}$ axetic,
 hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó (tốt hơn là, axit (S)-trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-$
 $\text{[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl}\}\{5-[2-(\text{metylsulfonyl})\text{etoxy}]pyrimidin-2-$
 $\text{yl}\}\text{amino})\text{metyl}]-4-(\text{triflometyl)phenyl}\}(\text{etyl})\text{amino})\text{metyl}]xyclohexyl\}$ axetic
 gần như tinh khiết về mặt quang học, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chất đồng phân đối ảnh quay trái của axit trans-4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó (tốt hơn là, chất đồng phân đối ảnh quay trái gần như tinh khiết về mặt quang học của axit trans-4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó).

Sáng chế cũng đề xuất thuốc chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa hợp chất đồng phân (S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất, và chất mang dược dụng.

Thuốc và dược phẩm làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu, và do đó chúng có thể được sử dụng làm thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh do tình trạng lượng cholesterol LDL trong máu cao gây nên (ví dụ, tình trạng tăng cholesterol LDL huyết, rối loạn lipid máu (tăng lipid máu), xơ cứng động mạch, xơ vữa động mạch, bệnh mạch máu ngoại vi, tăng cholesterol máu, tăng cholesterol máu di truyền, rối loạn chức năng tim mạch, chứng đau thắt ngực, chứng thiếu máu cục bộ, chứng thiếu máu cục bộ ở tim, chứng huyết khối, nhồi máu cơ tim, rối loạn do tái tưới máu, tình trạng tái phát hẹp do tạo hình mạch, tăng huyết áp, và bệnh tương tự).

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó để sản xuất thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh do tình trạng lượng cholesterol LDL trong máu cao gây nên; và sử dụng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó để phòng và/hoặc điều trị bệnh do tình trạng lượng cholesterol LDL trong máu cao gây nên.

Sáng chế cũng mô tả thuốc ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất; thuốc làm giảm lượng protein PCSK9 chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm

hoạt chất; thuốc ức chế sự tổng hợp protein PCSK9 chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất; và thuốc làm tăng lượng thụ thể LDL chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó để sản xuất thuốc ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của PCSK9, thuốc làm giảm lượng protein PCSK9, thuốc ức chế sự tổng hợp protein PCSK9, hoặc thuốc làm tăng lượng thụ thể LDL; và sử dụng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất trong thuốc ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của PCSK9, thuốc làm giảm lượng protein PCSK9, thuốc ức chế sự tổng hợp protein PCSK9, hoặc thuốc làm tăng lượng thụ thể LDL.

Sáng chế cũng mô tả thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh có liên quan đến PC (như bệnh ung thư, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh Alzheimer, bệnh truyền nhiễm do virus, và các bệnh tương tự) chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó để sản xuất thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh có liên quan đến PC; và sử dụng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó để phòng và/hoặc điều trị bệnh có liên quan đến PC.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả thuốc ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza chứa hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44 (axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-

bis(triflometyl)phenyl]ethyl}{5-[2-(methylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-triflometyl)phenyl}(ethylamino)methyl]xyclohexyl}axetic), hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất; thuốc ức chế sự tổng hợp HMG-CoA reductaza chứa hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất; và thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh do sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza gây nên (ví dụ, tình trạng viêm, bệnh ung thư, bệnh Alzheimer, chứng loãng xương, phì đại tuyến tiền liệt, bệnh cầu thận, tình trạng nhiễm giun, nhiễm virus, bệnh vảy nến, bệnh thoái hóa điểm vàng, và các bệnh tương tự) chứa hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó để sản xuất thuốc ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza, thuốc ức chế sự tổng hợp HMG-CoA reductaza, hoặc thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh do sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza gây ra; và hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó dùng làm hoạt chất trong thuốc ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza, thuốc ức chế sự tổng hợp HMG-CoA reductaza, hoặc thuốc phòng và/hoặc điều trị bệnh do sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza gây ra.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 ở động vật có vú bao gồm cả người trong cơ thể, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó; phương pháp làm giảm lượng protein PCSK9 ở động vật có vú bao gồm cả người *in vivo*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó; phương pháp ức chế sự tổng hợp protein PCSK9 ở động vật có vú bao gồm cả người *in vivo*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó; phương pháp làm tăng lượng thụ thể LDL ở động vật có vú bao gồm cả người *in vivo*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó; và phương pháp làm giảm lượng LDL trong máu ở động vật có vú bao gồm cả người *in vivo*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng và/hoặc điều trị bệnh do tình trạng lượng cholesterol LDL trong máu cao gây nên ở động vật có vú bao gồm cả người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó.

Sáng chế còn mô tả phương pháp phòng và/hoặc điều trị bệnh có liên quan đến PC ở động vật có vú bao gồm cả người, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza ở động vật có vú bao gồm cả người *in vivo*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó; phương pháp ức chế sự tổng hợp HMG-CoA reductaza ở động vật có vú bao gồm cả người *in vivo*, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất raxemat (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó; phương pháp phòng và/hoặc điều trị bệnh do sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza gây nên, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho động vật có vú bao gồm cả người sử dụng một lượng hữu hiệu hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) và/hoặc hợp chất đồng phân-(R) có công thức (II) ở dạng gần như tinh khiết về mặt quang học.

Mặc dù tài liệu patent 2 mô tả phương pháp điều chế hợp chất raxemat có công thức (I), nhưng rất khó để điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức

(III) hoặc hợp chất đồng phân-(R) có công thức (II) ở dạng gần như tinh khiết về mặt quang học như được mô tả dưới đây.

Cụ thể là, theo quan điểm chung, đã biết rằng hợp chất gần như tinh khiết về mặt quang học có thể được điều chế bằng cách tổng hợp raxemat, và sau đó phân giải về mặt quang học raxemat nhờ cột không đối xứng.

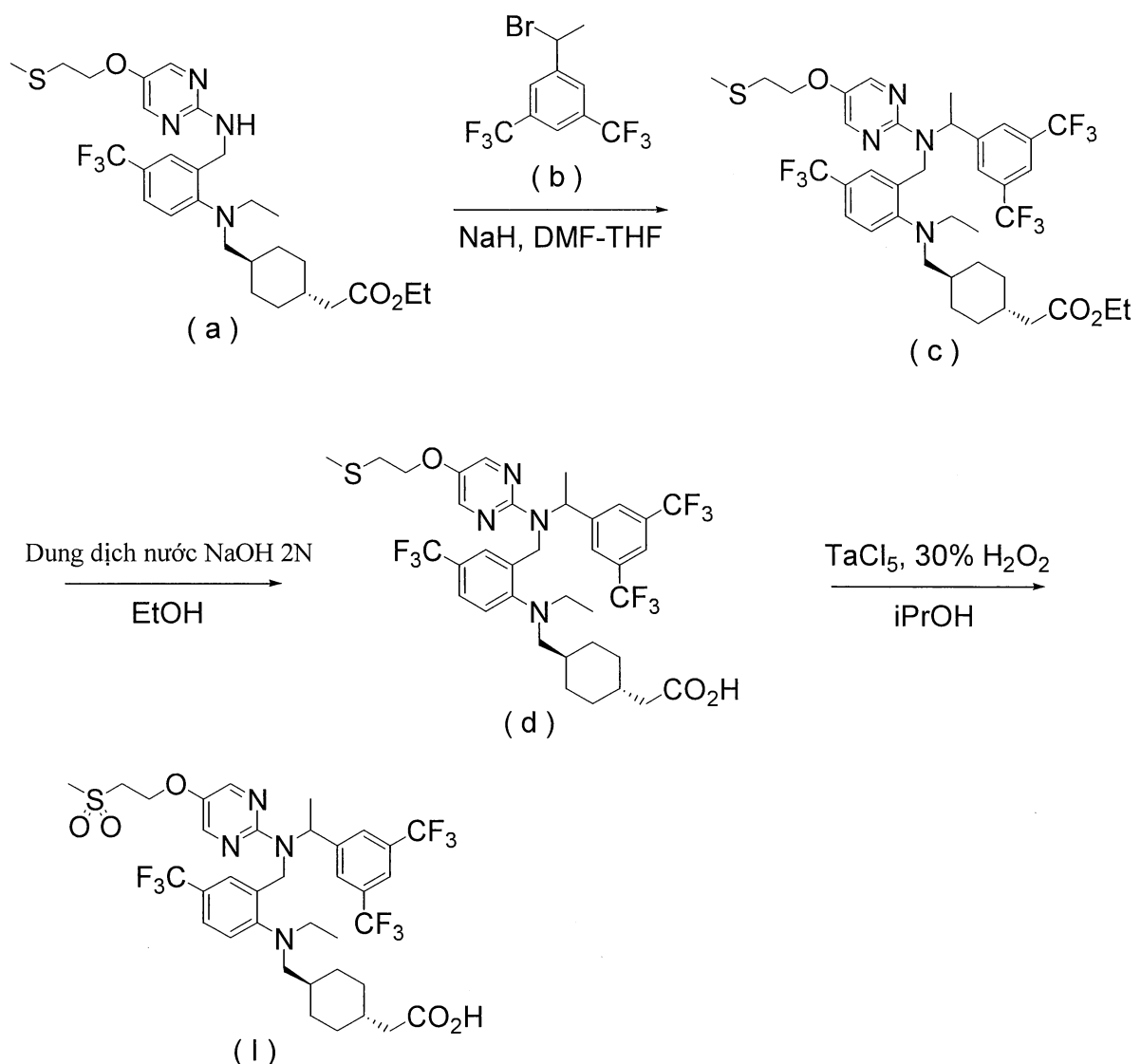
Tuy nhiên, trong quá trình phân giải về mặt quang học nhờ cột không đối xứng, đôi lúc rất khó để đưa ra các điều kiện phân giải đối với loại hợp chất nhất định, và quá trình này không thích hợp với quá trình tổng hợp ở quy mô công nghiệp. Thực tế, đã nhận thấy rằng việc đưa ra các điều kiện phân giải về mặt quang học nhờ cột không đối xứng để điều chế hợp chất đồng phân-(S) gần như tinh khiết về mặt quang học hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) là rất khó. Cụ thể là, đã thử phân đoạn mỗi chất đồng phân đối ảnh từ hợp chất raxemat có công thức (I) được điều chế theo phương pháp được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 45 đồng thời thay đổi các điều kiện khác nhau theo từng trường hợp như loại cột không đối xứng (ví dụ, CHIRALCEL OD-H, CHIRALCEL OJ-H, và cột tương tự), loại dung môi dùng làm pha động (ví dụ, hỗn hợp MeOH/TFA, hỗn hợp EtOH/TFA, và hỗn hợp tương tự), và tốc độ dòng của pha động. Tuy nhiên, quá trình phân giải vẫn không thành công trong hầu hết tất cả các điều kiện được áp dụng. Trong các trường hợp này, nhận thấy rằng mỗi chất đồng phân đối ảnh được phân tách thành công trong các điều kiện được mô tả trong ví dụ 1-1 mà sẽ được đề cập sau. Tuy nhiên, cũng nhận thấy rằng sản phẩm phân hủy (hợp chất este etyl) được tạo thành trong các điều kiện nêu trên.

Tài liệu patent 2 cũng mô tả rằng hợp chất raxemat có công thức (I) có

thể được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước liên hợp hợp chất trung gian có công thức (a) và hợp chất raxemat benzyl bromua có công thức (b) khi có mặt bazơ, thủy phân nhóm este của hợp chất thu được có công thức (c) để điều chế hợp chất có công thức (d), và cuối cùng oxy hóa nguyên tử lưu huỳnh của hợp chất có công thức (d) theo sơ đồ 1 nêu dưới đây.

Sơ đồ 1

[công thức 4]



Liên quan đến sơ đồ 1, các tác giả sáng chế đã cố gắng tạo ra hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II)

gần như tinh khiết về mặt quang học bằng cách sử dụng 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]-1-metansulfonyloxyetan quay quang thay vì hợp chất raxemat benzyl bromua có công thức (b). Tuy nhiên, phản ứng tách 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]-1-metansulfonyloxyetan ưu tiên xảy ra, và hợp chất đích không được tổng hợp thành công.

Ngoài ra, quy trình điều chế còn được thực hiện bằng cách sử dụng chất benzyl hóa quay quang có nhóm rời chuyển như nhóm toluensulfonyl, nhóm clometansulfonyl, hoặc nhóm 2,4,6-triisopropylbenzensulfonyl thay vì nhóm metansulfonyl. Tuy nhiên, hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) gần như tinh khiết về mặt quang học không được tổng hợp thành công như trong trường hợp sử dụng 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]-1-metansulfonyloxyetan.

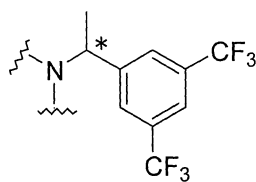
Nếu hợp chất benzyl bromua có công thức (b) được sử dụng, thì việc đưa nhóm [3,5-bis(triflometyl)phenyl]-1-etyl vào nguyên tử nitơ của hợp chất trung gian có công thức (a) luôn luôn được thực hiện thành công. Do đó, có thể tổng hợp được hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) gần như tinh khiết về mặt quang học bằng cách sử dụng hợp chất benzyl bromua quay quang thay vì hợp chất raxemat benzyl bromua có công thức (b).

Tuy nhiên, nhìn chung đã biết rằng, trong phản ứng thế ái nhân ion bromua bị loại, ion bromua được tổng hợp bằng phản ứng với benzyl bromua trong hệ phản ứng, và phản ứng raxemic hóa xảy ra. Ngoài ra, nói chung cũng đã biết rằng, trong phản ứng thế ái nhân ở vị trí benzyl, phản ứng thế kiểu SN1 cũng xảy ra cạnh tranh do sự ổn định của cation benzyl, và do đó phản ứng

raxemic hóa xảy ra một phần.

Đối với hợp chất có độ tinh khiết về mặt quang học vừa phải thu được nhờ độ tinh khiết về mặt quang học giảm do phản ứng raxemic hóa một phần (trong bản mô tả, "hợp chất có độ tinh khiết về mặt quang học vừa phải" có nghĩa là hợp chất có độ tinh khiết về mặt quang học không dưới 10% lượng dư chất đồng phân đối ảnh (enantiomeric excess-ee) và thấp hơn 90%ee, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20 đến 80%ee, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 40 đến 70%ee, và hợp chất có độ tinh khiết về mặt quang học vừa phải cũng có thể được dùng để chỉ là "hợp chất bán bất đối xứng". Ngoài ra, như đối với hợp chất bán bất đối xứng, nếu hợp chất, trong đó nguyên tử cacbon không đối xứng được đánh dấu bằng * trong cấu trúc riêng phần được thể hiện dưới đây dưới dạng cấu hình S, có mặt với lượng lớn hơn so với hợp chất dưới dạng cấu hình R, thì hợp chất này đặc biệt được dùng để chỉ là "hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S)". Trong khi đó, như đối với hợp chất bán bất đối xứng, nếu hợp chất trong đó nguyên tử cacbon không đối xứng được đánh dấu * ở dạng cấu hình R có mặt với lượng lớn hơn so với hợp chất ở dạng cấu hình S, thì hợp chất này đặc biệt được dùng để chỉ là "hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (R)".),

[công thức 5]



đã được biết rằng độ tinh khiết về mặt quang học của nó có thể được tăng lên bằng cách ưu tiên kết tinh một trong số các chất đồng phân đối ảnh.

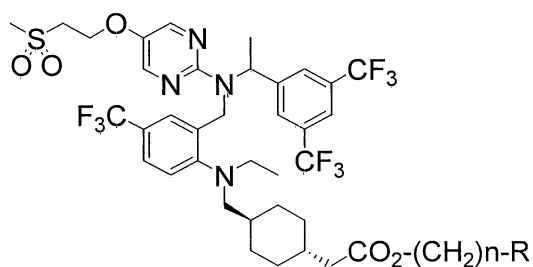
Tuy nhiên, theo nghiên cứu của các tác giả sáng chế, quá trình kết tinh không xảy ra trong trường hợp hợp chất raxemat có công thức (I) hoặc dẫn xuất este etyl của nó, và độ tinh khiết về mặt quang học của nó không được làm tăng lên thành công bằng quá trình kết tinh được ưu tiên.

Trong các trường hợp như được mô tả trên đây, các tác giả sáng chế đã chuyển hóa axit carboxylic của hợp chất raxemat có công thức (I) thành este benzyl, và nhận thấy rằng hợp chất este benzyl thu được được phân tách thành công dưới dạng tinh thể chứa raxemat là thành phần chính.

Sau đó, bằng cách điều chế hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV) của hợp chất este arylalkyl hoặc heteroarylalkyl, và sau đó kết tinh các tinh thể có độ tinh khiết về mặt quang học thấp chứa chủ yếu thành phần raxemat (dưới đây cũng được dùng để chỉ là "tinh thể giàu raxemat") và loại bỏ các tinh thể để thu được hợp chất este arylalkyl hoặc heteroarylalkyl có công thức (V) hoặc (V') có độ tinh khiết về mặt quang học cao, và sau đó bằng cách sử dụng hợp chất có công thức (V) hoặc (V') làm nguyên liệu ban đầu như được thể hiện trong sơ đồ 2 nêu dưới đây, các tác giả sáng chế đã điều chế thành công chất đồng phân đối ảnh mong muốn của hợp chất raxemat có công thức (I) (hợp chất đồng phân (S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II)) ở dạng gần như tinh khiết về mặt quang học.

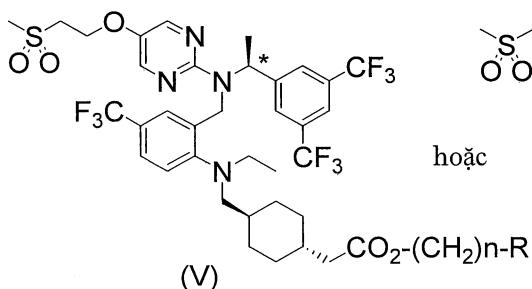
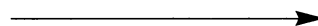
Sơ đồ 2

[Công thức 6]



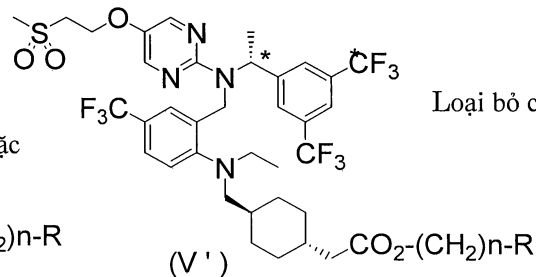
Hợp chất bán bất đối xứng (IV)

Kết tinh ưu tiên raxemat



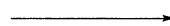
(V)

hoặc



(V')

Loại bỏ các tinh thể giàu raxemat

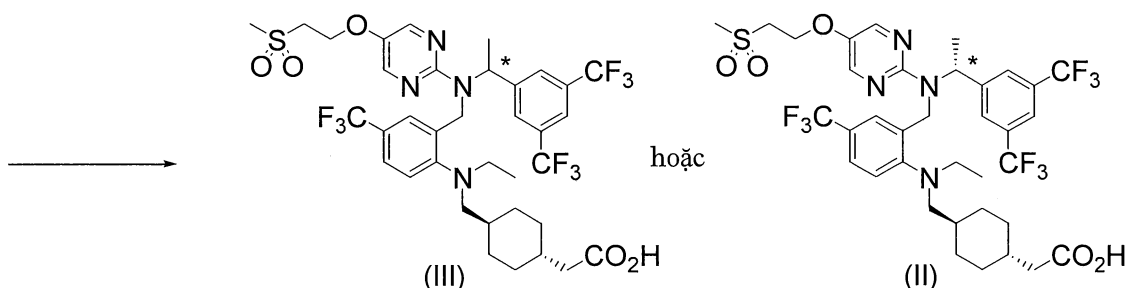


Chất đồng phân đối ảnh có độ tinh khiết về mặt quang

học cao (dung dịch cái)

+

Tinh thể giàu raxemat



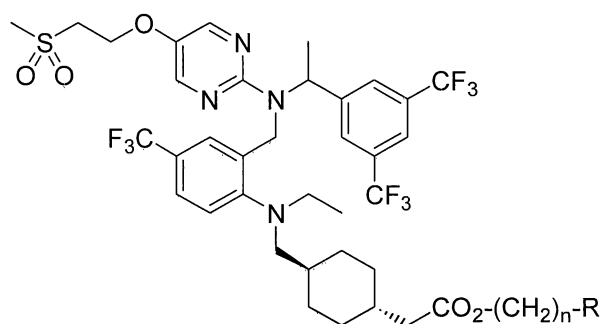
(III)

(II)

(trong sơ đồ này, R là nhóm C₆₋₁₀ aryl, mà có thể có phần tử thế, hoặc nhóm heteroaryl có từ 5 đến 10 cạnh mà có thể có phần tử thế, và n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6.)

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) gần như tinh khiết về mặt quang học, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, mà bao gồm bước loại bỏ các tinh thể giàu raxemat từ hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức chung (IV) dưới đây:

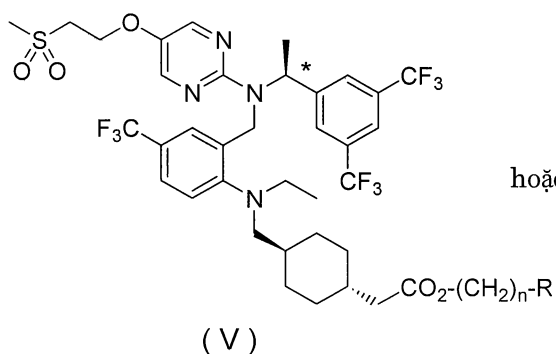
[Công thức 7]



(IV)

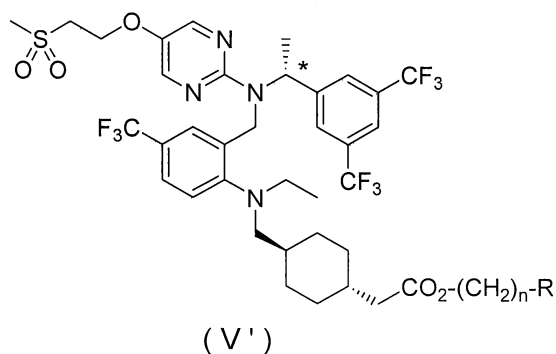
(trong công thức này, R là nhóm C_{6-10} aryl mà có thể có phần tử thế, hoặc nhóm heteroaryl có từ 5 đến 10 cạnh mà có thể có phần tử thế, và n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6) bằng cách kết tinh ưu tiên trong dung môi để thu được hợp chất gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức chung (V) hoặc (V') dưới đây:

[Công thức 8]



(V)

hoặc



(V')

(trong các công thức này, R và n có nghĩa giống như đã nêu trong công thức chung (IV)).

Bằng phương pháp nêu trên, nếu hợp chất có công thức chung (IV) là hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S), thì hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có thể được điều chế, và nếu hợp chất có công thức chung (IV) là hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (R), thì hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) có thể được điều chế.

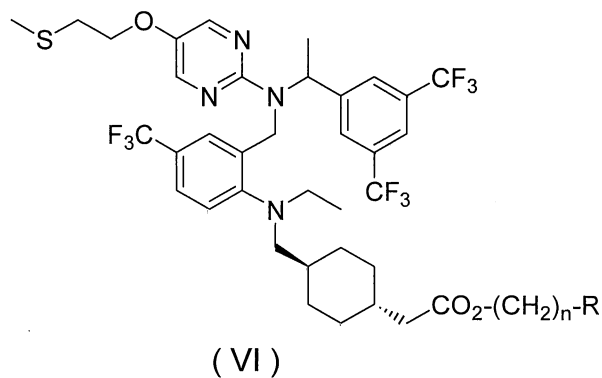
Sáng chế còn đề xuất phương pháp nêu trên, trong đó phương pháp này

bao gồm bước loại nhóm $-(CH_2)_n-R$ ra khỏi hợp chất có công thức chung (V) hoặc (V').

Sáng chế còn đề xuất:

(A) phương pháp nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức chung (VI) dưới đây:

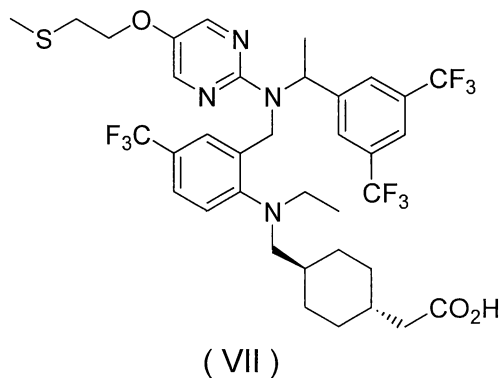
[Công thức 9]



(trong công thức này, R và n có nghĩa giống như đã nêu trong công thức chung (IV)) phản ứng với chất oxy hóa trong dung môi để điều chế hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức chung (IV);

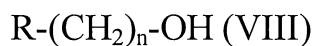
(B) phương pháp (A) nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức (VII) dưới đây:

[Công thức 10]



phản ứng với hợp chất có công thức chung (VIII) dưới đây:

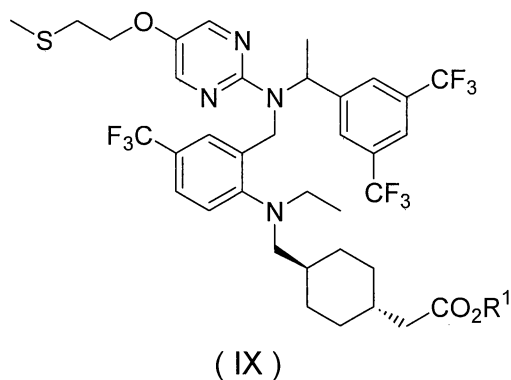
[Công thức 11]



(trong công thức này, R và n có nghĩa giống như đã nêu trong công thức chung (IV)) trong dung môi khi có mặt chất xúc tác để điều chế hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức chung (VI);

(C) phương pháp (B) nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thủy phân hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức chung (IX) dưới đây:

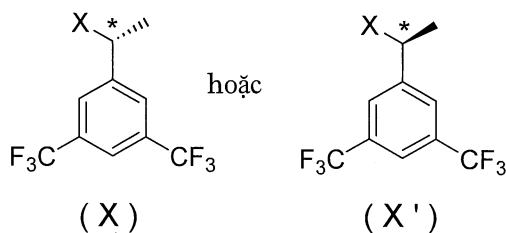
[Công thức 12]



(trong công thức này, R¹ là nhóm C₁₋₆ alkyl) trong dung môi khi có mặt bazơ để điều chế hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức (VII); và

(D) phương pháp (C) nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức chung (X) hoặc (X') dưới đây:

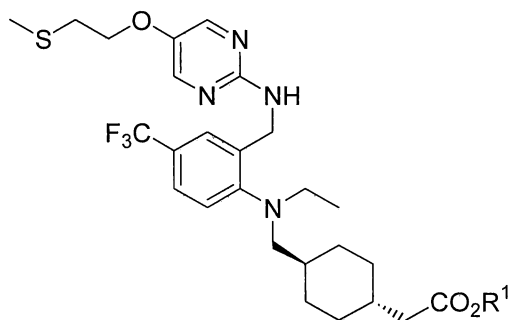
[Công thức 13]



(trong công thức này, X là nguyên tử halogen), và hợp chất có công thức chung

(XI) dưới đây:

[Công thức 14]



(XI)

(trong công thức này, R^1 có nghĩa giống như đã nêu trong công thức chung (IX))
phản ứng trong dung môi khi có mặt bazơ để điều chế hợp chất bán bất đối xứng của hợp chất có công thức chung (IX).

Sáng chế cũng đề xuất, phương pháp (D) nêu trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước halogen hóa hợp chất 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]etanol quay quang khi có mặt chất halogen hóa để điều chế hợp chất có công thức chung (X) hoặc (X').

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức chung (IV) nêu trên, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó. Hợp chất, trong đó R là phenyl, và n là 1, muối của nó, hoặc solvat của nó là một phương án được ưu tiên theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức chung (V) hoặc (V') nêu trên, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó. Hợp chất, trong đó R là phenyl, và n là 1, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó là một phương án được ưu tiên theo sáng chế.

Hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có tác dụng làm giảm lượng

protein PCSK9 và tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL tốt hơn, và có tác dụng làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu tốt hơn. Do đó, hợp chất này là hữu dụng làm, ví dụ, hoạt chất của thuốc để làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu, và tác dụng tương tự.

Hơn thế nữa, hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) cũng hữu dụng làm hoạt chất của thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh có liên quan đến PC, cụ thể hơn là, bệnh ung thư, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh Alzheimer, hoặc bệnh truyền nhiễm do virus.

Hơn thế nữa, theo phương pháp điều chế theo sáng chế, chất đồng phân đối ảnh mong muốn của hợp chất raxemat có công thức (I) (hợp chất đồng phân (S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II)) có thể được điều chế thuận lợi ở dạng gần như tinh khiết về mặt quang học. Ví dụ, tốt hơn là phương pháp này có thể được sử dụng làm phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học, mà hữu dụng làm hoạt chất của thuốc, hoặc phương pháp tương tự.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương thức thực hiện sáng chế

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gần như tinh khiết về mặt quang học" có nghĩa là độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất là 90%ee hoặc cao hơn, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 95 đến 100%ee, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 97 đến 100%ee.

Do đó, ví dụ "hợp chất axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic

gần như tinh khiết về mặt quang học”, “chất đồng phân đối ảnh quay trái của axit $\text{trans-}\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5\text{-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl}\{5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl\}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl\}(ethyl)amino)methyl]cyclohexyl\}acetic$ gần như tinh khiết về mặt quang học” và “hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học” có nghĩa là hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có độ tinh khiết về mặt quang học là 90%ee hoặc cao hơn, tốt hơn là có độ tinh khiết về mặt quang học nằm trong khoảng từ 95 đến 100%ee, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 97 đến 100%ee.

Theo sáng chế, tốt hơn nếu độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) là 98%ee hoặc cao hơn, tốt nhất là 99%ee hoặc cao hơn, như được xác định trong các điều kiện phân tích HPLC không đối xứng được mô tả trong ví dụ 1-1 nêu dưới đây, từ quan điểm thu được tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và/hoặc tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL tốt. Nếu đạt được độ tinh khiết về mặt quang học nêu trên, thì hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) hầu như không chứa chất đồng phân đối ảnh khác (hợp chất đồng phân (R) có công thức (II)).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nhóm C_{1-6} alkyl" có nghĩa là nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, và ví dụ về nhóm này bao gồm, ví dụ, nhóm methyl, nhóm ethyl, nhóm n-propyl, nhóm isopropyl, nhóm n-butyl, nhóm isobutyl, nhóm sec-butyl, nhóm tert-butyl, nhóm n-pentyl, nhóm isopentyl, nhóm neopentyl, nhóm n-hexyl, nhóm isohexyl, và nhóm tương tự.

Trong bản mô tả này, gốc " C_{6-10} aryl" của "nhóm C_{6-10} aryl" mà có thể có

phần tử thế" có nghĩa là nhóm hydrocacbon thơm có từ 6 đến 10 nguyên tử cacbon, ví dụ về các nhóm này bao gồm, ví dụ, nhóm phenyl, nhóm naphtyl, nhóm azulenyl, và nhóm tương tự.

Trong bản mô tả này, gốc "heteroaryl có từ 5 đến 10 cạnh" của "nhóm heteroaryl có từ 5 đến 10 cạnh mà có thể có phần tử thế" có nghĩa là nhóm dị vòng thơm loại vòng một vòng có từ 5 đến 10 cạnh, đa vòng hoặc vòng ngưng tụ chứa từ 1 đến 4 nguyên tử khác loại được chọn từ nguyên tử oxy, nguyên tử lưu huỳnh và nguyên tử nitơ làm nguyên tử cấu tạo vòng. Ví dụ về nhóm này bao gồm, ví dụ, nhóm furyl, nhóm thienyl, nhóm pyrolyl, nhóm oxazolyl, nhóm isoxazolyl, nhóm thiazolyl, nhóm isothiazolyl, nhóm imidazolyl, nhóm pyrazolyl, nhóm oxadiazolyl, nhóm thiadiazolyl, nhóm triazolyl, nhóm tetrazolyl, nhóm pyridyl, nhóm pyrimidyl, nhóm pyrazinyl, nhóm pyridazinyl, nhóm benzofuranyl, nhóm isobenzofuranyl, nhóm benzothienyl, nhóm indolyl, nhóm isoindolyl, nhóm indazolyl, nhóm benzimidazolyl, nhóm benzoxazolyl, nhóm benzisoxazolyl, nhóm benzothiazolyl, nhóm benzisothiazolyl, nhóm benzoxadiazolyl, nhóm benzothiadiazolyl, nhóm benzotriazolyl, nhóm quinolyl, nhóm isoquinolyl, nhóm xinnolyl, nhóm quinazolyl, nhóm quinoxalyl, nhóm phthalazinyl, nhóm naphtyridinyl, nhóm purinyl, nhóm pteridinyl, nhóm furopyridyl, nhóm thienopyridyl, nhóm pyrolopyridyl, nhóm oxazolopyridyl, nhóm thiazolopyridyl, nhóm imidazopyridyl, và nhóm tương tự.

Trong bản mô tả này, ví dụ về phần tử thế của "nhóm C₆₋₁₀ aryl mà có thể có phần tử thế", và "nhóm heteroaryl có từ 5 đến 10 cạnh mà có thể có phần tử thế" bao gồm, ví dụ, nguyên tử halogen, nhóm carboxyl, nhóm carbamoyl, nhóm sulfonyl, nhóm sulfamoyl, nhóm nitro, và nhóm tương tự. Số phần tử thế nằm

trong khoảng từ 1 đến số có thể thể tối đa, và nói chung các nhóm có thể có từ 1 đến 5 phần tử thể. Nguyên tử bất kỳ trong số các nguyên tử flo, nguyên tử clo, nguyên tử brom, và nguyên tử iot có thể được sử dụng làm nguyên tử halogen.

Trong các công thức chung, tốt hơn là nhóm C_{6-10} aryl mà có thể có phần tử thể là R là nhóm phenyl.

Trong các công thức chung, tốt hơn là số nguyên n là 1.

Trong các công thức chung, tốt hơn là, nhóm C_{1-6} alkyl như R^1 là nhóm C_{1-4} alkyl, tốt hơn nữa là nhóm etyl.

Trong các công thức chung, tốt hơn là nguyên tử halogen như X là nguyên tử clo hoặc nguyên tử brom, tốt hơn là nguyên tử brom.

Theo sáng chế, ví dụ về muối của mỗi hợp chất (ví dụ, hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hợp chất có công thức chung (IV), hợp chất có công thức chung (V), hợp chất có công thức chung (V'), và hợp chất tương tự) bao gồm, ví dụ, muối cộng axit, muối cộng bazơ, và muối tương tự, và muối này đặc biệt không bị giới hạn miễn là muối được dùng được sử dụng. Cụ thể là, ví dụ về muối cộng axit bao gồm muối cộng axit với axit vô cơ như hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua, sulfat, nitrat, và phosphat; và muối cộng axit với axit hữu cơ như benzoat, metansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat, p-toluensulfonat, maleat, fumarat, tartrat, xitrat, và axetat. Ví dụ về các muối cộng bazơ bao gồm muối cộng bazơ với kim loại như muối natri, muối kali, muối lithi, muối canxi và muối magie; các muối với amin như amoniac, trimetylamin, trietylamin, pyridin, colidin, và lutidin; muối cộng bazơ với bazơ hữu cơ như lysin và arginin, và muối tương tự.

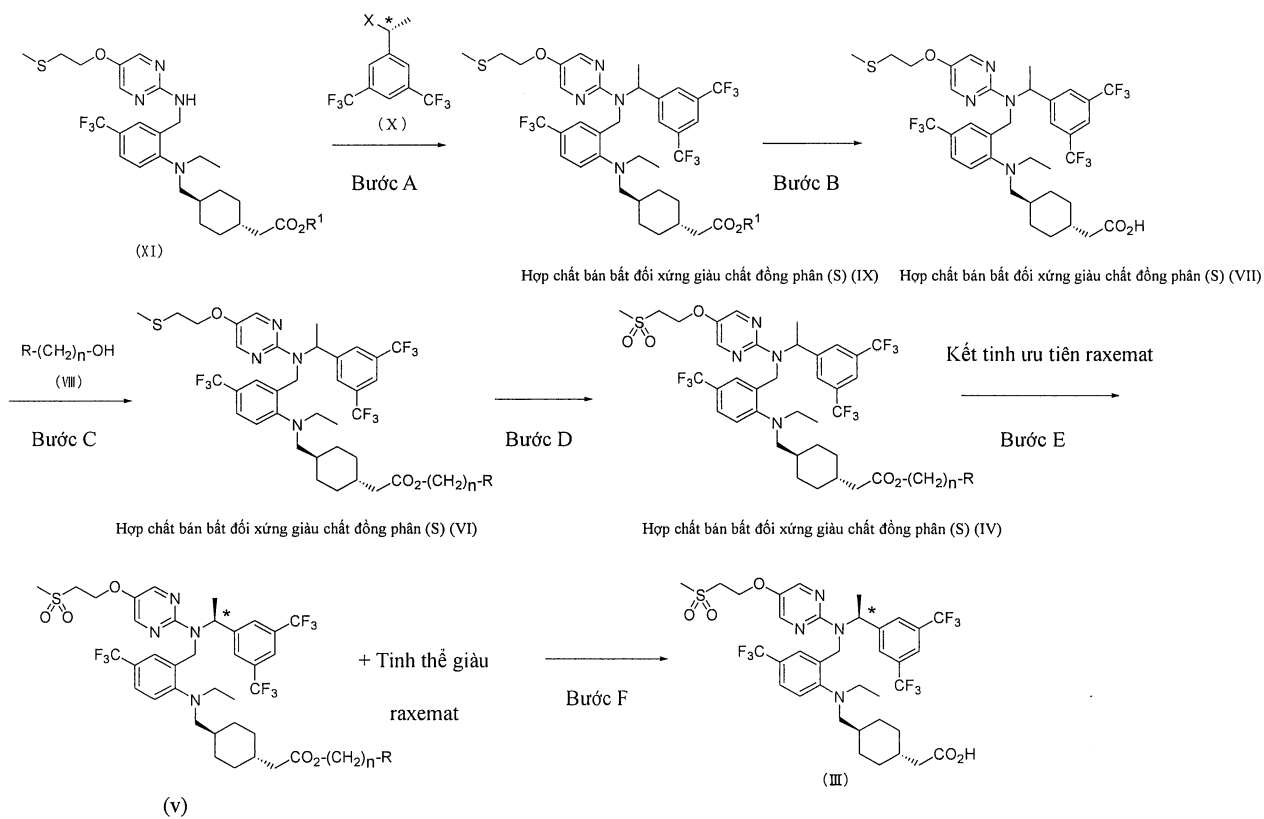
Theo sáng chế, ví dụ về dung môi tạo solvat của mỗi hợp chất (ví dụ,

hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hợp chất có công thức chung (IV), hợp chất có công thức chung (V), hợp chất có công thức chung (V'), và hợp chất tương tự) hoặc muối của nó bao gồm nước và dung môi hữu cơ chấp nhận được về mặt sinh lý, ví dụ, etanol, hexan, etyl axetat, và dung môi tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này. Ví dụ về hoạt chất của thuốc theo sáng chế bao gồm, ví dụ, hydrat và hoạt chất tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ về phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học theo sáng chế được thể hiện trong sơ đồ 3 được nêu dưới đây, và ví dụ về phương pháp điều chế hợp chất đồng phân (R) gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức (II) theo sáng chế được thể hiện trong sơ đồ 4 nêu dưới đây (trong các sơ đồ dưới đây, R, R¹, X, và n có nghĩa như nêu trên).

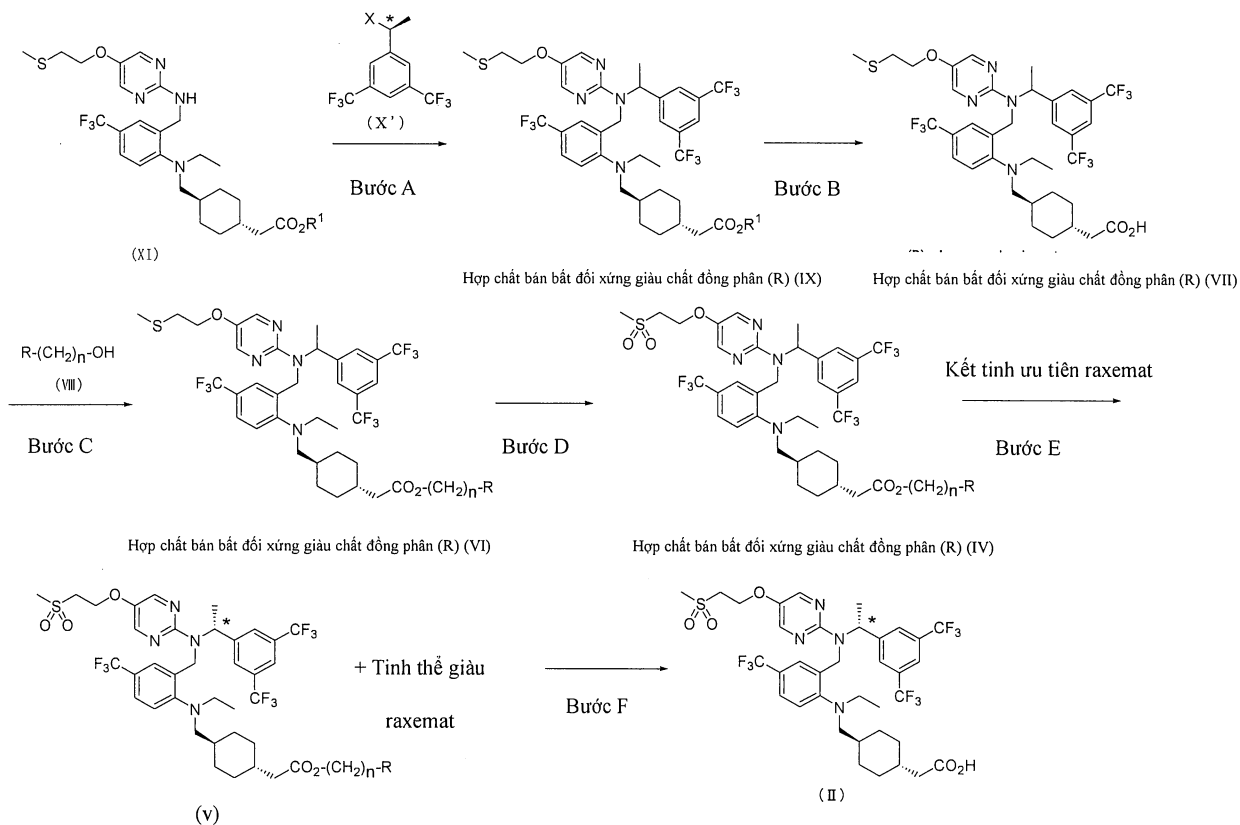
Sơ đồ 3

[Công thức 15]



Sơ đồ $\rightarrow$ Dung dịch cái

[Công thức 16]



<Bước A> Dung dịch cái

Bước này là để cho amin có công thức (XI) phản ứng với benzyl halogenua quay quang có công thức (X) hoặc (X') khi có mặt bazơ để điều chế hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IX). Hợp chất có công thức (X) hoặc (X') có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0 đương lượng mol, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,5 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (XI).

Amin có công thức (XI) là hợp chất đã biết, và phương pháp điều chế hợp chất này được mô tả trong tài liệu patent 2 chẳng hạn.

Phản ứng này có thể được thực hiện trong dung môi khi có mặt bazơ. Dung môi này đặc biệt không bị giới hạn. Ví dụ, N,N-dimetylformamit, N-metylpyrrolidon, dimetyl sulfoxit, dioxan, tetrahydrofuran, axetonitril, propionitril, và hợp chất tương tự có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp. Ví dụ được ưu tiên về dung môi bao gồm tetrahydrofuran, N,N-dimetylformamit, và dung môi kết hợp của chúng. Thể tích của dung môi đặc biệt không bị giới hạn. Dung môi có thể được sử dụng với lượng gấp từ 2 đến 20 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 5 đến 12 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 7 đến 10 lần (thể tích/trọng lượng), so với hợp chất (XI).

Bazơ này đặc biệt không bị giới hạn. Ví dụ, hydrua kim loại kiềm hydrua như lithi hydrua, natri hydrua, và kali hydrua; các kim loại kiềm như lithi kim loại, natri kim loại, và kali kim loại; các hydroxit kim loại kiềm như lithi hydroxit, natri hydroxit, và kali hydroxit; các cacbonat kim loại kiềm như lithi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, và xesi cacbonat; các amit kim loại kiềm như lithi diisopropylamit, natri diisopropylamit, kali diisopropylamit, lithi hexametyldisilazit, natri hexametyldisilazit, và kali hexametyldisilazit; alkoxy

của kim loại kiềm như t-butoxynatri, và t-butoxykali; và các hợp chất lithi hữu cơ như n-butyllithi, s-butyllithi, và t-butyllithi có thể được sử dụng. Ví dụ được ưu tiên về bazơ này bao gồm hydrua kim loại kiềm, và ví dụ được ưu tiên hơn là natri hydrua. Bazơ này có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 5,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (XI).

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ -80 đến 100°C , tốt hơn là nằm trong khoảng từ -30 đến 50°C , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ -20 đến 5°C . Thời gian phản ứng thường là từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 8 giờ. Trong phản ứng này, tốt hơn là sử dụng benzyl halogenua gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức (X) hoặc (X'). Bằng phản ứng này, phản ứng raxemic hóa xảy ra một phần, và hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IX) được thu nhận. Hợp chất bán bất đối xứng này có công thức (IX) có thể được sử dụng trong bước tiếp theo mà không qua một bước xử lý nào. Độ tinh khiết về mặt quang học về cơ bản được duy trì trong suốt bước B đến D, và hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV) có độ tinh khiết về mặt quang học tương đương với độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IX) có thể thu được. Theo nghiên cứu của các tác giả sáng chế, ngay cả khi phản ứng với benzyl halogenua quay quang có công thức (X) hoặc (X') được thực hiện trong bước này bằng cách sử dụng amin có công thức (XI) trong đó R^1 là nhóm benzyl, thì hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IX) làm hợp chất mục tiêu không được thu nhận với hiệu suất thỏa mãn, nhưng nếu nhóm C_{1-6} alkyl được sử dụng làm R^1 , thì hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IX)

mong muốn có thể thu được với hiệu suất đủ.

<Bước B>

Bước này là để thủy phân hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IX) để điều chế hợp chất bán bất đối xứng có công thức (VII).

Phản ứng này được thực hiện trong dung môi khi có mặt bazơ. Mặc dù, dung môi không bị giới hạn cụ thể, ví dụ, rượu như metanol, etanol, propanol, isopropanol, và tert-butanol, axetonitril, tetrahydrofuran, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, N-metylpyrrolidon, dioxan, nước, và dung môi tương tự có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp. Ví dụ được ưu tiên về dung môi bao gồm hỗn hợp gồm rượu và nước, và ví dụ được ưu tiên hơn về dung môi bao gồm hỗn hợp gồm etanol và nước. Mặc dù, thể tích của dung môi không bị giới hạn cụ thể, nhưng dung môi có thể được sử dụng với lượng gấp từ 10 đến 100 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 20 đến 50 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn nữa là với lượng gấp từ 30 đến 40 lần (thể tích/trọng lượng), dựa trên hợp chất có công thức (IX).

Bazơ không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, hydroxit kim loại kiềm như lithi hydroxit, natri hydroxit, và kali hydroxit; các cacbonat kim loại kiềm như lithi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, và xesi cacbonat; amoni hydroxit bậc bốn như tetrametylamoni hydroxit, tetraetylamoni hydroxit, tetrapropylamoni hydroxit, tetrabutylamoni hydroxit, và benzyltrimetylamoni hydroxit (Triton B), và hydroxit tương tự có thể được sử dụng. Ví dụ về bazơ được ưu tiên bao gồm hydroxit kim loại kiềm, và ví dụ được ưu tiên hơn bao gồm natri hydroxit. Tốt hơn nếu bazơ này được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 5,0 đương lượng mol, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2,0 đến 3,0

đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (IX).

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 80°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C. Tốt hơn là thời gian phản ứng thường nằm trong khoảng từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 30 phút đến 12 giờ, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 2 đến 5 giờ.

<Bước C>

Bước này là để ngưng tụ hợp chất bán bất đối xứng có công thức (VII) và rượu có công thức (VIII) để điều chế hợp chất bán bất đối xứng có công thức (VI). Rượu có công thức (VIII) có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (VII).

Phản ứng này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất ngưng tụ trong dung môi khi có mặt hoặc không có mặt bazơ. Phản ứng này có thể được thực hiện khi có mặt chất tăng tốc ngưng tụ. Mặc dù, dung môi không bị giới hạn cụ thể, ví dụ, hydrocacbon được halogen hóa như 1,2-dicloetan, cloroform, và diclometan; este của axit axetic như etyl axetat, và isopropyl axetat; hydrocacbon thơm như toluen, và benzen; tetrahydrofuran, dioxan, axetonitril, propionitril, và dung môi tương tự có thể được sử dụng. Ví dụ về dung môi được ưu tiên bao gồm hydrocacbon được halogen hóa, và ví dụ được ưu tiên hơn bao gồm dicloetan. Mặc dù, thể tích của dung môi đặc biệt không bị giới hạn, nhưng dung môi có thể được sử dụng với lượng gấp từ 5 đến 100 lần (thể tích/khối lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 10 đến 20 lần (thể tích/khối lượng), dựa trên hợp chất có công thức (VII).

Bazơ đặc biệt không bị giới hạn. Ví dụ, bazơ hữu cơ như pyridin, 4-dimethylaminopyridin (DMAP), colidin, lutidin, 1,8-diazabixyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), 1,5-diazabixyclo[4.3.0]non-5-en (DBN), 1,4-diazabixyclo[2.2.2]octan (DABCO), trietylamin, diisopropyletylamin, diisopropylpentylamin, và trimetylamin; hydrua kim loại kiềm như lithi hydrua, natri hydrua, và kali hydrua; hydroxit kim loại kiềm như lithi hydroxit, natri hydroxit, và kali hydroxit; các cacbonat kim loại kiềm như lithi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, và xesi cacbonat; bicarbonat kim loại kiềm như natri hydrocacbonat, và kali hydrocacbonat, và bazơ tương tự có thể được sử dụng.

Mặc dù chất tăng tốc ngưng tụ đặc biệt không bị giới hạn, DMAP, 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (HODhbt), N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboxyimit (HONB), pentaflorphenol (HOPfp), N-hydroxyphtalimit (HOPht), N-hydroxysucxinimit (HOSu), và chất tăng tốc ngưng tụ tương tự có thể được sử dụng. DMAP được ưu tiên làm chất tăng tốc ngưng tụ. Chất tăng tốc ngưng tụ có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (VII).

Mặc dù, chất ngưng tụ đặc biệt không bị giới hạn, nhưng dixyclohexylcarbodiimit (DCC), diisopropylcarbodiimit (DIPCI), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-etyl-carbodiimit (thường được gọi là carbodiimit hòa tan trong nước (WSC)), WSC·HCl, và chất ngưng tụ tương tự có thể được sử dụng. WSC·HCl được ưu tiên làm chất ngưng tụ. Chất ngưng tụ có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0 đương lượng mol, tốt hơn là

với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (VII).

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 80°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 30°C. Tốt hơn là, thời gian phản ứng thường nằm trong khoảng từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 8 đến 16 giờ.

<Bước D>

Bước này là để oxy hóa nguyên tử lưu huỳnh của hợp chất bán bất đối xứng có công thức (VI) để tạo ra hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV).

Các phương pháp thông thường để chuyển hóa nguyên tử lưu huỳnh thành nhóm sulfonyl có thể được sử dụng làm phương pháp oxy hóa. Ví dụ, dung dịch nước hydro peroxit có thể được sử dụng làm chất oxy hóa trong phản ứng oxy hóa nhờ một lượng xúc tác natri tungstat, molypden dioxit diclorua, hoặc tantan pentaclorua, natri perborat, oxon (đã đăng ký nhãn hiệu), natri periodat, kali periodat, axit meta-cloperbenzoic (mCPBA), pyridini clocromat (PCC), pyridini dicromat (PDC), N-closucxinimit (NCS), N-bromosucxinimit (NBS), N-iodosucxinimit (NIS), iot, bromin, và chất oxy hóa tương tự có thể được sử dụng. Chất oxy hóa được ưu tiên là hỗn hợp của tantan pentaclorua và dung dịch nước hydro peroxit. Tantan pentaclorua có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (VI). Dung dịch nước hydro peroxit có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong

khoảng từ 4,0 đến 6,0 đương lượng mol, dựa trên hợp chất có công thức (VI).

Dung môi đặc biệt không bị giới hạn. Ví dụ về các dung môi này bao gồm, ví dụ, nước, rượu như metanol, etanol, isopropanol và tert-butanol, axetonitril, axeton, tetrahydrofuran, diclometan, cloroform, 1,2-dicloetan, cacbon tetraclorea, N,N-dimetylformamit, axit axetic, và dung môi tương tự. Ví dụ về dung môi được ưu tiên bao gồm rượu, và ví dụ về dung môi được ưu tiên hơn bao gồm 2-propanol. Mặc dù thể tích của dung môi không bị giới hạn cụ thể, nhưng dung môi có thể được sử dụng với lượng gấp từ 5 đến 100 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 10 đến 30 lần (thể tích/trọng lượng), dựa trên hợp chất có công thức (VI).

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C, tốt hơn nữa là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 30°C. Tốt hơn là, thời gian phản ứng thường nằm trong khoảng từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa là thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ, tốt nhất là thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 8 đến 16 giờ.

<Bước E>

Bước này là để ưu tiên kết tinh các tinh thể giàu raxemat có độ tinh khiết về mặt quang học thấp từ hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV) để tạo ra chất đồng phân quang học có công thức (V) hoặc (V') có độ tinh khiết về mặt quang học cao.

Bước này là để kết tinh các tinh thể giàu raxemat trong dung môi chứa hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV), và sau đó loại bỏ các tinh thể giàu raxemat thu được để tạo ra chất đồng phân quang học có công thức (V) hoặc

(V') có độ tinh khiết về mặt quang học cao còn lại trong dung dịch cái.

Ví dụ về dung môi này bao gồm rượu như metanol, etanol, n-propanol, và isopropanol. Rượu có mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon được ưu tiên, và etanol và isopropanol đặc biệt được ưu tiên. Lượng dung môi là lượng gấp từ 2 đến 20 lần (thể tích/khối lượng), tốt hơn là lượng gấp từ 4 đến 10 lần (thể tích/khối lượng), tốt hơn nữa là với lượng gấp từ 5 đến 8 lần (thể tích/khối lượng), dựa trên hợp chất có công thức (IV).

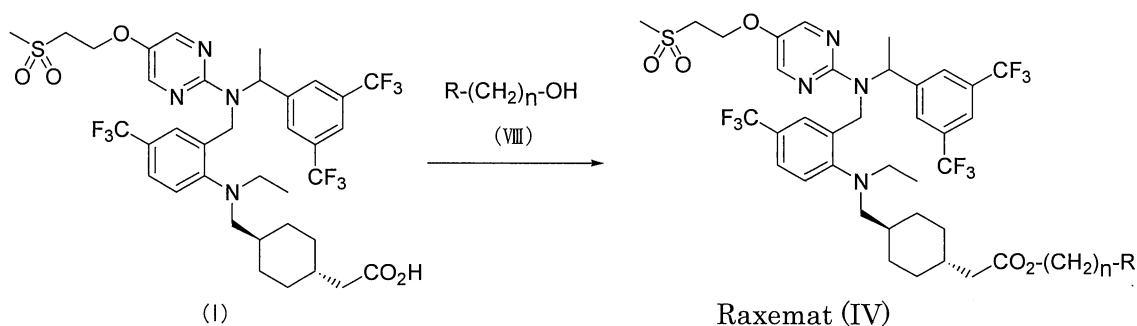
Quá trình kết tinh có thể được thực hiện bằng cách hòa tan hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV) trong dung môi, và khuấy dung dịch này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 40°C, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 20°C, trong khoảng thời gian từ 30 phút đến hai ngày, tốt hơn là trong khoảng thời gian từ 15 đến 24 giờ. Nếu cần làm tăng hiệu suất của tinh thể, sau đó có thể tiến hành khuấy trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 24 giờ, tốt hơn là trong khoảng thời gian từ 2 đến 5 giờ, trong điều kiện làm nguội dung dịch đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10 đến 10°C, tốt hơn là đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5 đến 5°C. Các tinh thể giàu raxemat có thể là các tinh thể chứa hoàn toàn raxemat, hoặc chúng thường là các tinh thể có độ tinh khiết về mặt quang học thấp (từ 0 đến 40%ee) chứa thành phần raxemat với lượng nằm trong khoảng từ 60 đến 100%.

Bước này có thể được thực hiện khi có mặt các hạt tinh thể raxemat được điều chế riêng rẽ. Các hạt tinh thể raxemat sử dụng trong quy trình này là các tinh thể raxemat của hợp chất có công thức chung (IV). Ví dụ về các tinh thể này bao gồm các tinh thể raxemat của este benzyl của axit trans- $\{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl)\{5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-$

yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic.

Hơn thế nữa, các tinh thể giàu raxemat thu được trong bước E này có thể được sử dụng làm các hạt tinh thể raxemat mà không cần xử lý. Các tinh thể thu được riêng rẽ bằng cách điều chế raxemat của hợp chất có công thức chung (IV) và kết tinh liên tục cũng có thể được sử dụng làm các hạt tinh thể raxemat. Raxemat này của hợp chất có công thức chung (IV) có thể được điều chế bằng, ví dụ, phương pháp được mô tả dưới đây.

[Công thức 17]



Trong phản ứng này, hợp chất raxemat có công thức (I) và rượu có công thức (VIII) được ngưng tụ để điều chế raxemat có công thức (IV). Rượu có công thức (VIII) có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2 đương lượng mol, tính theo lượng hợp chất raxemat có công thức (I).

Phản ứng này có thể được thực hiện trong dung môi bằng cách sử dụng chất ngưng tụ khi có mặt hoặc không có mặt bazơ. Phản ứng này có thể được thực hiện khi có mặt chất tăng tốc ngưng tụ. Dung môi đặc biệt không bị giới hạn. Ví dụ về các dung môi này bao gồm hydrocacbon được halogen hóa như 1,2-dicloetan, cloroform, và diclometan; este của axit axetic như etyl axetat, và isopropyl axetat; hydrocacbon thơm như toluen, và benzen; tetrahydrofuran,

dioxan, axetonitril, propionitril, và dung môi tương tự có thể được sử dụng. Ví dụ về dung môi được ưu tiên bao gồm hydrocacbon được halogen hóa, và ví dụ về dung môi được ưu tiên hơn bao gồm diclometan. Mặc dù, thể tích của dung môi đặc biệt không bị giới hạn, nhưng dung môi có thể được sử dụng với lượng gấp từ 5 đến 100 lần (thể tích/khối lượng), tốt hơn nữa là với lượng gấp từ 10 đến 20 lần (thể tích/khối lượng), tính theo lượng hợp chất raxemat có công thức (I).

Bazơ đặc biệt không bị giới hạn. Ví dụ, bazơ hữu cơ như pyridin, 4-dimethylaminopyridin (DMAP), colidin, lutidin, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en (DBN), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO), triethylamin, diisopropyletylamin, diisopropylpentylamin, và trimethylamin; hydrua kim loại kiềm như lithi hydrua, natri hydrua, và kali hydrua; hydroxit kim loại kiềm như lithi hydroxit, natri hydroxit, và kali hydroxit; các cacbonat kim loại kiềm như lithi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, và xesi cacbonat; bicarbonat kim loại kiềm như natri hydrocacbonat, và kali hydrocacbonat, và bazơ tương tự có thể được sử dụng.

Mặc dù, chất tăng tốc ngưng tụ đặc biệt không bị giới hạn, DMAP, 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (HODhbt), N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboxyimit (HONB), pentaflorphenol (HOPfp), N-hydroxyphtalimit (HOPht), N-hydroxysuccinimit (HOSu), và chất tăng tốc ngưng tụ tương tự có thể được sử dụng. DMAP được ưu tiên làm chất tăng tốc ngưng tụ. Chất tăng tốc ngưng tụ có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong

khoảng từ 0,05 đến 0,5 đương lượng mol, tính theo hợp chất raxemat có công thức (I).

Mặc dù, chất ngưng tụ đặc biệt không bị giới hạn, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), diisopropylcarbodiimide (DIPCI), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide (thường được gọi là carbodiimide hòa tan trong nước (WSC)), WSC·HCl, và chất ngưng tụ tương tự có thể được sử dụng. WSC·HCl được ưu tiên làm chất ngưng tụ. Chất ngưng tụ này có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2 đương lượng mol, tính theo hợp chất raxemat có công thức (I).

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 80°C, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 30°C. Tốt hơn là, thời gian phản ứng thường nằm trong khoảng từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa là thường nằm trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ, tốt nhất là thường nằm trong khoảng từ 8 đến 16 giờ.

Quá trình kết tinh raxemat của hợp chất có công thức (IV) (quy trình điều chế các hạt tinh thể raxemat) có thể được tiến hành trong các điều kiện tương tự với các điều kiện được áp dụng cho quá trình kết tinh các tinh thể giàu raxemat ưu tiên từ hợp chất bán bất đối xứng có công thức (IV).

Cụ thể hơn là, hợp chất raxemat có công thức (IV) có thể được hòa tan trong dung môi, và dung dịch này có thể được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 40°C, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 20°C, trong khoảng thời gian từ 30 phút đến hai ngày, tốt hơn là trong khoảng thời gian từ 15 đến 24 giờ. Nếu muốn tăng hiệu suất tinh thể, có thể tiến hành thêm

bước khuấy trong 30 phút đến 24 giờ, tốt hơn là trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 2 đến 5 giờ, trong điều kiện làm nguội dung dịch đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10 đến 10°C , tốt hơn là đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5 đến 5°C . Ví dụ về dung môi bao gồm rượu như metanol, etanol, n-propanol, và isopropanol. Rượu mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 6 nguyên tử cacbon được ưu tiên, và etanol và isopropanol là đặc biệt được ưu tiên. Lượng dung môi là lượng gấp từ 2 đến 20 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 4 đến 10 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn nữa là với lượng gấp từ 5 đến 8 lần (thể tích/trọng lượng), tính theo lượng hợp chất raxemat có công thức (IV).

<Bước F>

Bước này là để tiến hành khử bảo vệ hợp chất có công thức (V) hoặc (V') có độ tinh khiết về mặt quang học cao để điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) gần như tinh khiết về mặt quang học.

Phản ứng này được thực hiện bằng cách khử xúc tác nhờ chất xúc tác kim loại và nguồn hydro trong dung môi, hoặc phản ứng thủy phân nhờ bazơ trong dung môi. Nếu khử bảo vệ được tiến hành bằng cách khử xúc tác, rượu như metanol, etanol, isopropanol và tert-butanol; ete như diethyl ete, tetrahydrofuran và dioxan; este của axit axetic như ethyl axetat, và isopropyl axetat; axit axetic; nước, và chất tương tự có thể được sử dụng làm dung môi. Rượu được ưu tiên làm dung môi, và etanol được ưu tiên hơn. Dung môi này có thể được sử dụng với lượng gấp từ 5 đến 30 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 5 đến 15 lần (thể tích/trọng lượng), dựa trên hợp chất có công

thức (V) hoặc (V').

Hydro, xyclohexadien, axit formic, amoni format, và chất tương tự có thể được sử dụng làm nguồn hydro. Hydro được ưu tiên làm nguồn hydro. Paladi/cacbon, paladi đen, niken Raney, platin dioxit, platin đen, và chất tương tự có thể được sử dụng làm chất xúc tác kim loại. Paladi/cacbon được ưu tiên làm chất xúc tác kim loại. Paladi/cacbon có thể được sử dụng với lượng gấp từ 0,001 đến 0,5 lần (trọng lượng/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 0,05 đến 0,2 lần (trọng lượng/trọng lượng), dựa trên hợp chất có công thức (V) hoặc (V') theo lượng 10% Pd-C (âm).

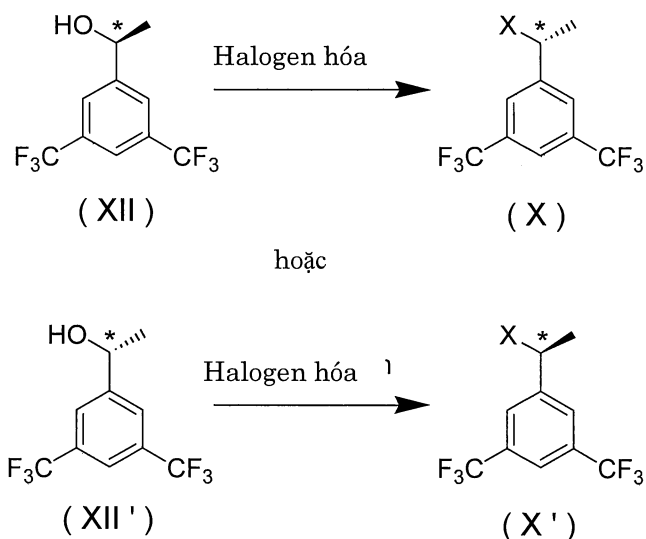
Khử xúc tác thường được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 60°C, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 30°C. Tốt hơn nếu, thời gian phản ứng thường nằm trong khoảng từ 5 phút đến 24 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 16 giờ, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1 đến 6 giờ.

Nếu tiến hành khử bảo vệ bằng phản ứng thủy phân, ví dụ, rượu như metanol, etanol, propanol, 2-propanol, và t-butanol, axetonitril, propionitril, tetrahydrofuran, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, N-metylpyrrolidon, dioxan, nước, và chất tương tự có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, mặc dù, dung môi không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, hydroxit kim loại kiềm như lithi hydroxit, natri hydroxit, và kali hydroxit; các cacbonat kim loại kiềm như lithi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, và xesi cacbonat; amoni hydroxit bậc bốn như tetrametylamoni hydroxit, tetraethylamoni hydroxit, tetrapropylamoni hydroxit, tetrabutylamoni hydroxit, và benzyltrimethylamoni hydroxit (Triton B), và chất tương tự có thể được sử dụng làm bazơ, mặc dù bazơ không bị giới hạn

cụ thể.

Benzyl halogenua quay quang có công thức (X) hoặc (X') có thể được tổng hợp, ví dụ, bằng phương pháp được mô tả dưới đây.

[Công thức 18]



Phản ứng này bao gồm bước halogen hóa 1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]etanol quay quang có công thức (XII) hoặc (XII') khi có mặt chất halogen hóa để điều chế hợp chất 1-halo-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]etan quay quang có công thức (X) hoặc (X') với hiệu quả cao mà không làm giảm đáng kể độ tinh khiết về mặt quang học.

Ví dụ về chất halogen hóa được sử dụng cho phản ứng này bao gồm chất clo hóa như thionyl clorua, phospho triclорua, phospho pentaclorua và phospho oxyclorua; chất brom hóa như phospho tribromua, phospho tribromua và hydro bromua (dung dịch 30% trong axit axetic), phospho tribromua và pyridin, N-bromosuccinimit và metyl sulfit, N-bromosuccinimit và triphenylphosphin, 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan và triphenylphosphin, bromodimetylsulfoni bromua, pyridini bromua perbromua và hexametyldisilan, bromin và triphenylphosphin, bromin và tributylphosphin, bromin và metyl sulfit, kẽm

bromua và triphenylphosphin và dimetyl azodicarboxyl, lithi bromua và clotrimetylsilan, lithi bromua và trifloaxetic anhydrua, bromotrimetylsilan, cacbon tetrabromua và triphenylphosphin, và thionyl bromua; và chất iot hóa như hydro iodua, và kali iodua và axit phosphoric. Nếu chất halogen hóa là chất brom hóa, phospho tribromua và hydro bromua (dung dịch 30% trong axit axetic), 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan và triphenylphosphin, và N-bromosuccinimide và metylsulfite được ưu tiên.

Cụ thể là, phản ứng sử dụng phospho tribromua và hydro bromua làm chất halogen hóa, và phản ứng sử dụng 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan và triphenylphosphin làm chất halogen hóa đặc biệt được giải thích dưới đây.

<Phản ứng sử dụng phospho tribromua và hydro bromua (dung dịch 30% trong axit axetic) làm chất halogen hóa >

Nếu phospho tribromua và hydro bromua (dung dịch 30% trong axit axetic) được sử dụng làm chất halogen hóa, thì phospho tribromua được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 2,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,6 đương lượng mol, tính theo lượng phenyletanol có công thức (XII) hoặc (XII'). Hydro bromua được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,7 đến 3,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,2 đương lượng mol, tính theo lượng phenyletanol có công thức (XII) hoặc (XII').

Phản ứng này có thể được thực hiện khi có mặt hoặc khi không có mặt dung môi. Nếu phản ứng được thực hiện khi có mặt dung môi, thì dung môi được sử dụng đặc biệt không bị giới hạn miễn là dung môi không tham gia vào phản ứng. Ví dụ về dung môi này bao gồm, ví dụ, hydrocacbon thơm như

benzen, toluen, xylen, mesitylen, clobenzen, 1,2-diclobenzen, và nitrobenzen; hydrocacbon béo như n-pentan, n-hexan, xyclohexan, n-heptan, n-octan, và n-decan; hydrocacbon được halogen hóa như metylen clorua, 1,2-dicloetan, cloroform, và cacbon tetracloetua, và dung môi tương tự. Trong số các dung môi này, benzen, toluen, xylen, metylen clorua, 1,2-dicloetan, n-pentan, n-hexan, và n-heptan được ưu tiên, và đặc biệt là, toluen, metylen clorua, và n-heptan được ưu tiên hơn. Các dung môi này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, và lượng dung môi được sử dụng đặc biệt không bị giới hạn.

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ -50 đến 150°C , tốt hơn là nằm trong khoảng từ -20 đến 80°C , tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0 đến 15°C . Nói chung, tốt hơn là thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 36 giờ, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 12 đến 24 giờ.

<Phản ứng sử dụng 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan và triphenylphosphin làm chất halogen hóa>

Nếu 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan và triphenylphosphin được sử dụng làm chất halogen hóa, thì 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2 đương lượng mol, tính theo lượng phenyletanol có công thức (XII) hoặc (XII'). Triphenylphosphin được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0 đương lượng mol, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,2 đương lượng mol, tính theo lượng phenyletanol có công thức (XII) hoặc (XII').

Phản ứng này có thể được thực hiện khi có mặt dung môi. Dung môi

được sử dụng đặc biệt không bị giới hạn miễn là dung môi này không tham gia vào phản ứng. Ví dụ về dung môi này bao gồm, ví dụ, hydrocacbon thơm như benzen, toluen, xylen, mesitylen, clobenzen, 1,2-diclobenzen, và nitrobenzen; hydrocacbon béo như n-pentan, n-hexan, xyclohexan, n-heptan, n-octan, và n-decan; hydrocacbon được halogen hóa như metylen clorua, 1,2-dicloetan, cloroform, và cacbon tetracolorua, và dung môi tương tự. Ví dụ về dung môi được ưu tiên bao gồm hydrocacbon thơm hoặc hydrocacbon được halogen hóa, ví dụ được ưu tiên hơn bao gồm benzen, toluen, xylen, metylen clorua, và 1,2-dicloetan, và ví dụ đặc biệt được ưu tiên bao gồm toluen, metylen clorua, và 1,2-dicloetan. Các dung môi này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp. Mặc dù thể tích của dung môi đặc biệt không bị giới hạn, nhưng dung môi có thể được sử dụng với lượng gấp từ 1 đến 10 lần (thể tích/trọng lượng), tốt hơn là với lượng gấp từ 2 đến 4 lần (thể tích/trọng lượng), dựa vào lượng phenyletanol có công thức (XII) hoặc (XII').

Nhiệt độ phản ứng thường nằm trong khoảng từ -50 đến 150°C , tốt hơn nữa là thường nằm trong khoảng từ -20 đến 80°C , tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0 đến 30°C . Tốt hơn là, thời gian phản ứng thường nằm trong khoảng từ 5 phút đến 48 giờ, tốt hơn nữa là thường nằm trong khoảng từ 30 phút đến 36 giờ, tốt nhất là thường nằm trong khoảng từ 1 đến 2 giờ.

Hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó có tác dụng ức chế chống lại sự biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 như được bộc lộ cụ thể trong các ví dụ dưới đây. Hợp chất này cũng có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL, và có tác dụng làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu *in vivo*.

Mặc dù sáng chế không bị ràng buộc bởi đánh giá dưới đây, nhưng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó được cho là ức chế sự tổng hợp protein PCSK9, do đó ức chế sự thoái biến thụ thể LDL và làm tăng lượng thụ thể LDL, và kết quả là, hợp chất này thúc đẩy sự gắn kết LDL trong máu với thụ thể LDL. Thúc đẩy sự gắn kết LDL trong máu với thụ thể LDL còn được cho là một trong số các yếu tố để thể hiện tác dụng làm giảm trị số cholesterol LDL trong máu.

Do đó, thuốc và dược phẩm chứa hợp chất đồng phân (S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất có thể được sử dụng làm thuốc để phòng và/hoặc điều trị tình trạng tăng cholesterol LDL huyết cũng như là các bệnh như bệnh rối loạn lipid máu (tăng lipid máu), bệnh xơ cứng động mạch, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh mạch máu ngoại vi, bệnh tăng cholesterol máu, bệnh tăng cholesterol máu di truyền, rối loạn chức năng tim mạch, chứng đau thắt ngực, chứng thiếu máu cục bộ, chứng thiếu máu cục bộ ở tim, chứng huyết khối, chứng nhồi máu cơ tim, rối loạn do tái tưới máu, tình trạng tái phát hẹp do tạo hình mạch, và tăng huyết áp.

Ngoài ra, kể từ khi biết rằng các enzym chuyển hóa tiền protein (proprotein convertase-PC) bao gồm PCSK9 là các enzym có liên quan đến sự khởi phát, sự tiến triển, sự trầm trọng và tình trạng khác của bệnh ung thư, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh Alzheimer, và bệnh truyền nhiễm do virus, thì việc sử dụng thuốc và dược phẩm chứa hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó làm hoạt chất có thể được coi là thuốc để phòng và/hoặc điều trị các bệnh nêu trên có liên quan đến PC.

Hợp chất raxemat có công thức (I) và hợp chất được mô tả trong tài liệu

patent 2, ví dụ 44 (axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(methylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic) có tác dụng ức chế chống lại sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza, như được bộc lộ cụ thể trong phần ví dụ dưới đây. Do đó, sử dụng hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44, hoặc chất đồng phân đối ảnh của nó, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó cũng được coi là thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh do sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza gây ra (ví dụ, các bệnh đi kèm sự tổng hợp isoprenoit (axit farnesylpyrophosphoric, axit geranylgeranylpyrophosphoric, và axit tương tự) mà gây ra sự cải biến sau dịch mã của nhiều protein như Ras, Rho và Rac và lipid, đặc biệt là, tình trạng viêm, bệnh ung thư, bệnh Alzheimer, chứng loãng xương, phì đại tuyến tiền liệt, bệnh cầu thận, tình trạng nhiễm giun, nhiễm virus, bệnh vẩy nến, bệnh thoái hóa điểm vàng, và bệnh tương tự).

Mỗi hoạt chất nêu trên có thể được sử dụng làm dược phẩm theo sáng chế. Tốt hơn là, hoạt chất có thể được sử dụng làm dược phẩm để sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa bằng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường miệng bao gồm, ví dụ, viên nén, viên nang, bột, cốm được sơ chế, cốm, dung dịch, siro, và dạng tương tự, và ví dụ về dược phẩm thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, thuốc tiêm như thuốc tiêm tĩnh mạch và thuốc tiêm bắp, dung dịch truyền nhỏ giọt, thuốc đạn, thuốc xông hít, thuốc nhỏ mắt, thuốc nhỏ mũi, các chế phẩm dùng qua da, chế phẩm dùng qua niêm mạc và dạng tương tự, tuy nhiên, dược phẩm này không bị giới hạn ở các

ví dụ này.

Dược phẩm nêu trên có thể được bào chế bằng cách bổ sung các chất phụ gia được dụng hoặc chấp nhận được về mặt dược lý. Ví dụ về các chất phụ gia được dụng hoặc chấp nhận được về mặt dược lý bao gồm, ví dụ, tá dược, chất kết dính, chất độn, chất gây rã, chất hoạt động bề mặt, chất làm trơn, chất gây phân tán, chất đệm, chất bảo quản, chất giảm nhẹ, chất thơm, chất bao, chất pha loãng, và chất tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Liều thuốc theo sáng chế đặc biệt không bị giới hạn, và liều này có thể thích hợp được chọn tùy thuộc vào loại bệnh, mục đích dùng, tức là dùng để phòng bệnh hoặc dùng để điều trị bệnh, loại hoạt chất, và dạng tương tự, và liều này cũng có thể được làm tăng hoặc làm giảm thích hợp tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau mà thường được xem xét, như cân nặng và tuổi của bệnh nhân, triệu chứng, và đường dùng. Ví dụ, để dùng qua đường miệng, thuốc này có thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 500mg theo khối lượng của hoạt chất là liều hằng ngày cho người lớn. Liều này có thể được chọn thích hợp bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và không bị giới hạn ở các khoảng nêu trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa bởi các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Các thuật ngữ viết tắt sử dụng trong các ví dụ dưới đây có nghĩa sau.

s: vạch đơn

d: vạch đôi

t: vạch ba

q: vạch bốn

m: vạch đa

br: phổ rộng

J: hằng số kết hợp

Hz: hec

CDCl_3 : cloroform được đơteri hóa

$^1\text{H-NMR}$: cộng hưởng từ hạt nhân proton

IR: phổ hấp thụ hồng ngoại

Ví dụ 1: Thiết lập phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học

Ví dụ 1-1: Phân giải về mặt quang học nhờ cột không đối xứng

Đã nhận thấy rằng, nếu sử dụng các điều kiện dưới đây, mỗi chất đồng phân đối ảnh có thể được tách ra khỏi hợp chất raxemat có công thức (I) được điều chế theo phương pháp được mô tả trong tài liệu patent 2 (công bố patent quốc tế WO2008/129951), ví dụ 45, và các điều kiện này có thể được sử dụng để đánh giá độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) và hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) bằng phân tích HPLC không đối xứng. Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp đánh giá độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất raxemat có công thức (I), hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hoặc hợp chất đồng phân (R) có công thức (II), hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó nhờ các điều kiện phân tích HPLC không đối xứng sau (đặc biệt là kết hợp cột và pha động nêu dưới đây).

Cột: CHIRALCEL OD-H

Pha động: hexan/etanol/TFA = 90/10/0,1

Tốc độ dòng: 1,0ml/phút

Nhiệt độ cột: 40°C

Chiều dài bước sóng phát hiện: 242nm

Thời gian lưu: đỉnh thứ nhất: 21,3 phút (chất đồng phân (R)), đỉnh thứ hai: 23,7 phút (chất đồng phân (S))

Tuy nhiên, cũng nhận thấy rằng, do dung môi của pha động được bao gồm trong các điều kiện nêu trên chứa EtOH và TFA, nên chúng phản ứng với axit carboxylic của hợp chất raxemat có công thức (I) và/hoặc mỗi chất đồng phân đối ảnh để tạo thành sản phẩm thoái biến (hợp chất este etyl).

Do đó, mặc dù phân giải về mặt quang học nhờ cột không đối xứng trong các điều kiện nêu trên là có thể được sử dụng để đánh giá độ tinh khiết về mặt quang học (phân tích HPLC không đối xứng), nhưng không thích hợp để điều chế mỗi hợp chất trong số các chất đồng phân đối ảnh gần như tinh khiết về mặt quang học, đặc biệt là để điều chế ở quy mô lớn.

Ví dụ 1-2: Phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học bằng cách kết tinh ưu tiên

Nguyên tắc chung của phương pháp điều chế hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học bằng cách kết tinh ưu tiên được tiến hành bởi các tác giả sáng chế được thể hiện trong sơ đồ 5 dưới đây.

Cấu hình tuyệt đối của mỗi hợp chất được xác định từ cấu hình tuyệt đối của (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan được nêu trong bước 1.

Hơn thế nữa, độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất đồng phân (S) có công thức (III) (axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-

yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic)
 thu được trong bước 6 được xác định bằng phân tích HPLC không đối xứng
 trong các điều kiện được mô tả trong phần 1-1 trên đây.

Hơn thế nữa, độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất 1-bromo-1-
 [3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan thu được trong bước 1, và este benzyl của axit
 trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-
 (metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-
 (triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic thu được trong bước 4
 và 5 được đánh giá bằng phân tích HPLC không đối xứng trong các điều kiện
 dưới đây. Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp đánh giá độ tinh khiết về
 mặt quang học của mỗi hợp chất, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, mà sử
 dụng các điều kiện phân tích HPLC không đối xứng dưới đây (đặc biệt là kết
 hợp cột dưới đây và pha động dưới đây).

Các điều kiện của phân tích HPLC không đối xứng đối với 1-bromo-1-[3,5-
 bis(triflometyl)phenyl]etan

Cột: CHIRALPAK AS-RH

Pha động: etanol/nước = 60/40

Tốc độ dòng: 0.5ml/phút

Nhiệt độ cột: 25°C

Chiều dài bước sóng phát hiện: 220nm

Thời gian lưu: đỉnh thứ nhất: 21,8 phút (chất đồng phân (R)), đỉnh thứ hai: 26,0
 phút (chất đồng phân (S))

Các điều kiện của phân tích HPLC không đối xứng đối với hợp chất este benzyl
 của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-

(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic

Cột: CHIRALCEL OD-H

Pha động: hexan/etanol = 80/20

Tốc độ dòng: 1,0ml/phút

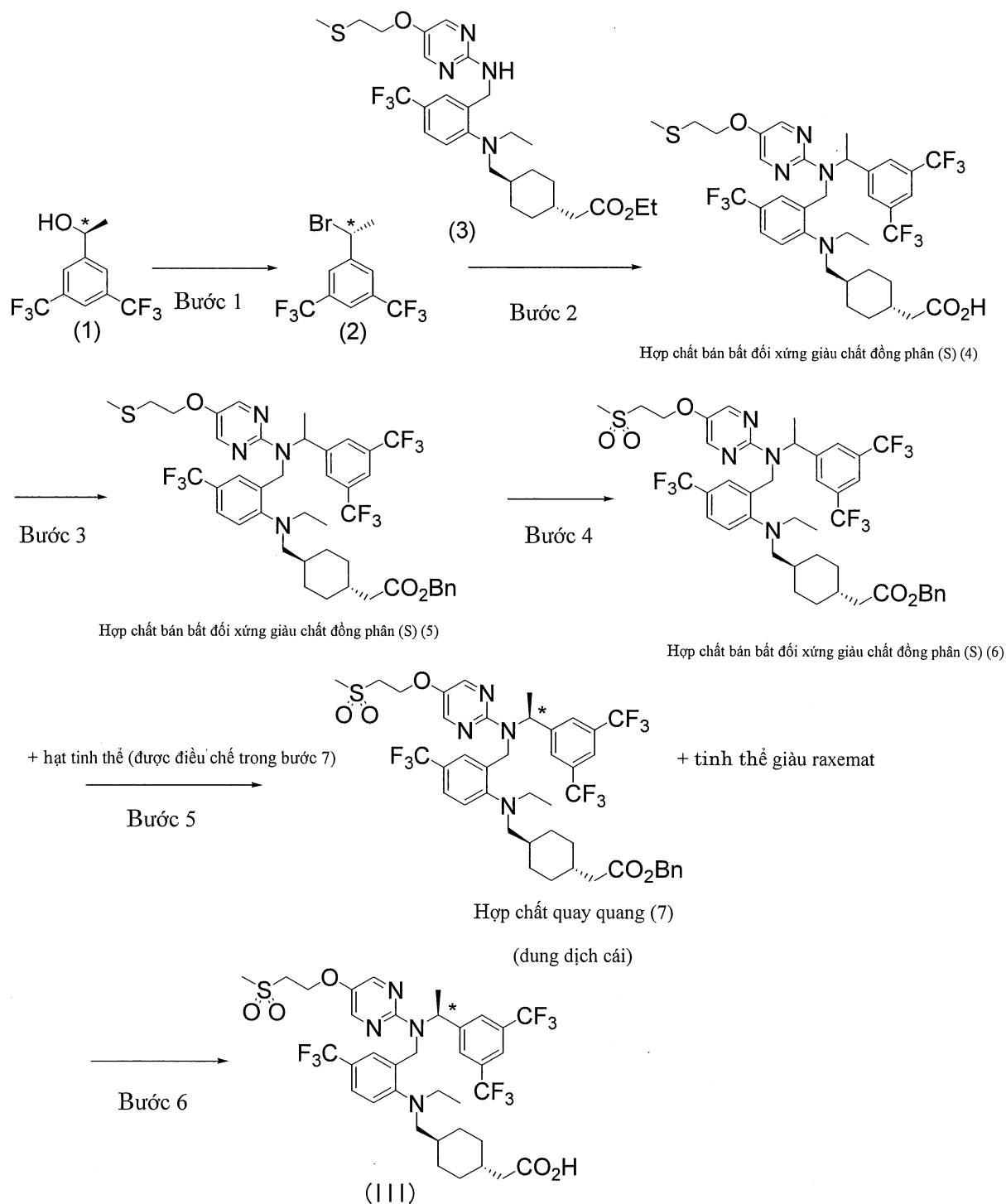
Nhiệt độ cột: 40°C

Chiều dài bước sóng phát hiện: 242nm

Thời gian lưu: đỉnh thứ nhất: 11,3 phút (chất đồng phân (R)), đỉnh thứ hai: 13,0 phút (chất đồng phân (S))

Sơ đồ 5

[Công thức 19]



trong sơ đồ này, Et là nhóm etyl, và Bn là nhóm benzyl.)

Bước 1: Quy trình điều chế (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]etan

(R)-1-Bromo-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]etan được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong phần 1-(a) nêu dưới đây, và cấu hình tuyệt đối của nó được khẳng định như sau. Cụ thể là, cấu hình được thực hiện bằng cách

chuyển hóa (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan thu được thành (S)-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etylamin, và so sánh dấu hiệu của sự quay riêng đo được thực tế của nó với dấu hiệu của sự quay riêng của sản phẩm chuẩn bán trên thị trường là (S)-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etylamin có cấu hình tuyệt đối đã biết.

Ngoài ra, (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan cũng được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong mục 1-(b) dưới đây.

1-(a): Quy trình điều chế (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan (1)

Dưới điều kiện khí argon, 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetracloetan (7,57g, 23,2mmol) được hòa tan trong toluen (12,5ml), bổ sung triphenylphosphin (6,1g, 23,2mmol) vào dung dịch này ở nhiệt độ 0°C, và khuấy hỗn hợp này trong 30 phút. Bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa (S)-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etanol có công thức (1) (5,0g, 19,4mmol, >99,5%ee) trong toluen (12,5ml) vào hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút hoặc hơn 10 phút, và sau đó làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ trong phòng, và khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ này. Bổ sung n-hexan (25ml) vào hỗn hợp phản ứng này, và lọc hỗn hợp này qua đệm xelit. Rửa dịch lọc liên tục bằng nước, dung dịch nước natri hydrocacbonat bão hòa, và dung dịch nước muối bão hòa, làm khô bằng natri sulfat, và sau đó làm bay hơi dưới áp suất giảm. Chưng cất cạn thu được dưới áp suất giảm (56°C, 0,7mmHg) để thu được 5,52g (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan có công thức (2) ở dạng dầu không màu (hiệu suất: 88,6%).

Phân tích HPLC không đối xứng: độ tinh khiết về mặt quang học >99,5%ee (đỉnh chính: đỉnh thứ nhất), tốc độ chuyển hóa $\geq 99\%$

$[\alpha]_D^{25} +59,1$ ($c = 1,03$, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,08 (3H, d, $J=7,1\text{Hz}$), 5,21 (1H, q, $J=7,1\text{Hz}$), 7,81 (1H, s), 7,87 (2H, s)

Xác định cấu hình tuyệt đối của hợp chất (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan

Bổ sung natri azit (64,4mg, 0,990mmol) vào dung dịch chứa (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan có công thức (2) (106mg, 0,336mmol, 99%ee) thu được ở mục 1-(a) nêu trên trong N,N-dimetylformamit (1ml), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -18 đến -15°C trong 4 giờ. Chiết dung dịch phản ứng này bằng etyl axetat/n-hexan (1:1) và nước, rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước muối bão hòa, làm khô bằng natri sulfat khan, và sau đó cô dưới áp suất giảm để thu được 111,5mg 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl azit (sản phẩm thô: 111,5mg).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,61 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$), 4,79 (1H, q, $J=6,8\text{Hz}$), 7,78 (2H, s), 7,84 (1H, s)

Hòa tan 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl azit (sản phẩm thô: 111,5mg) thu được trong metanol (6ml) và bổ sung paladi-fibroin (18mg) vào dung dịch này để thay thế hydro, và sau đó khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng qua đệm xelit, cô dịch lọc dưới áp suất giảm, và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột trên silicagel (cloroform:metanol có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 50:1 đến 5:1) để thu được 77,6mg 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etylamin ở dạng dầu không màu (hiệu suất: 91%, trong 2 bước).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,42 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$), 1,58 (2H, br-s), 4,30 (1H, q, $J=6,8\text{Hz}$), 7,75 (1H, s), 7,85 (2H, s)

Sự quay riêng của 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etylamin thu được là như sau.

$$[\alpha]_D^{25} -15,9 \text{ (c = 1,31, CHCl}_3\text{)}$$

Sự quay riêng của sản phẩm chuẩn có bán trên thị trường ((S)-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etylamin (Central GlassCo., Ltd., Lot. 0102000, độ tinh khiết về mặt quang học: 99%ee)) là như sau.

$$[\alpha]_D^{25} -15,9 \text{ (c = 1,15, CHCl}_3\text{)}$$

Dấu hiệu của sự quay riêng được đo thực tế được nhận thấy là phù hợp với dấu hiệu của sự quay riêng của sản phẩm chuẩn có bán trên thị trường, và do đó, 1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etylamin thu được được khẳng định là chất đồng phân (S). Ngoài ra, do amin này được thu từ 1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan thông qua phản ứng thế ái nhân ion azit, 1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan thu được trong mục 1-(a) nêu trên được khẳng định là chất đồng phân (R).

1-(b): Quy trình điều chế (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan có công thức (2)

Dưới điều kiện khí quyển argon, bổ sung nhỏ giọt phospho tribromua (157,3g, 0,58mol) vào (S)-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etanol có công thức (1) (300g, 1,16mol, 96%ee) ở nhiệt độ thấp hơn 20°C trên bề nước, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 19 đến 22°C trong 30 phút. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng này, và bổ sung nhỏ giọt hydro bromua (dung dịch 30% trong axit axetic, 228ml, 1,16mol) ở nhiệt độ thấp hơn 0°C, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 13 đến 15°C trong 16 giờ. Rót hỗn hợp phản ứng vào nước đá, và chiết hỗn hợp này bằng n-hexan (2 lần, mỗi lần 3l). Kết hợp các

lớp hữu cơ, rửa liên tục bằng dung dịch nước natri hydrocacbonat bão hòa (31), và dung dịch nước muối bão hòa (31), làm khô bằng magie sulfat khan, và sau đó cô dưới áp suất giảm (90 đến 100mmHg) để thu được 389,2g sản phẩm thô. Tinh chế sản phẩm thô thu được bằng sắc ký cột (silicagel: 900g, dung môi phát hiện: n-hexan) để thu được 349,8g (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan có công thức (2) ở dạng dầu không màu (hiệu suất: 93,8%).

Đỉnh thứ nhất được nhận thấy là đỉnh chính trong phân tích HPLC không đối xứng như được mô tả dưới đây, và do đó, 1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan được điều chế ở mục 1-(b) cũng được khẳng định là chất đồng phân (R), giống như chất đồng phân thu được ở mục 1-(a).

Phân tích HPLC không đối xứng: độ tinh khiết về mặt quang học: >93,9%ee (đỉnh chính: đỉnh thứ nhất), tốc độ chuyển hóa: 97,8%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,08 (3H, d, $J=7,1\text{Hz}$), 5,21 (1H, q, $J=7,1\text{Hz}$), 7,81 (1H, s), 7,87 (2H, s)

Bước 2: Quy trình điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của axit trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5\text{-bis(triflometyl)phenyl]etyl}\}\{5-[2\text{-(methylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}\}\text{amino}\})\text{metyl}]-4\text{-(triflometyl)phenyl}\}(\text{etyl})\text{amino}\})\text{metyl}\}\text{xyclohexyl}\}\text{axetic}$

Dưới khí quyển argon, bổ sung NaH (60% trong dầu, 119g, 2,98mol) vào dung dịch chứa etyl trans- $\{4-[(\{2-[(\{5-[2\text{-(methylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}\}\text{amino}\})\text{metyl}]-4\text{-(triflometyl)phenyl}\}\text{amino}\})\text{metyl}\}\text{xyclohexyl}\}\text{axetat}$ có công thức (3) (565,4g, 0,99mol) được tổng hợp bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu patent 2 (công bố patent quốc tế WO2008/129951) trong tetrahydrofuran

khan (THF, 2,26l) trong điều kiện làm lạnh trên đá, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng này đến nhiệt độ -30°C , và bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa (R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan có công thức (2) (682g, 1,99mol, 93,9%ee) thu được trong bước 1 trong N,N-dimetylformamit khan (4,53l) sao cho nhiệt độ bên trong của hệ phản ứng được duy trì là -15°C hoặc thấp hơn, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -15 đến -1°C trong 5 giờ. Rót hỗn hợp phản ứng vào dung dịch đã trộn chứa nước đá (35l) và toluen (30l), bổ sung axit xitric vào hỗn hợp này đến độ pH tối đa = 6,9, và tách lớp hữu cơ.

Chiết lớp chứa nước hai lần bằng toluen (20l), kết hợp các lớp hữu cơ, làm khô bằng magie sulfat khan, và sau đó cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Hòa tan sản phẩm thô trong etanol (8l), bổ sung dung dịch nước NaOH 2M (1,24l, 2,48mol) vào dung dịch này trong điều kiện làm lạnh trên đá, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 50°C trong 3,5 giờ. Bổ sung dung dịch nước HCl 1M vào hỗn hợp phản ứng này trong điều kiện làm lạnh trên đá đến độ pH tối đa của hỗn hợp là 5,4, rót hỗn hợp này vào nước (25l), và chiết hỗn hợp này 2 lần bằng etyl axetat (22l). Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước muối bão hòa (12l), làm khô bằng magie sulfat khan, và sau đó cô dưới áp suất giảm, và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột (silica gel: 21g, dung môi phát hiện: heptan/axeton có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 7/1 đến 3/1) để thu được hợp chất bán bất đối xứng có công thức (4) của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (dầu màu vàng, 744,1g, hiệu suất: 96%).

(R)-1-bromo-1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etan có công thức (2) mà cấu hình tuyệt đối của nó được khẳng định như được mô tả trong bước 1 nêu trên được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu, và phản ứng thế ái nhân bằng amin có công thức (3) được tiến hành. Do đó, hợp chất bán bất đối xứng thu được có công thức (4) là hợp chất giàu chất đồng phân (S).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,85-0,96 (7H, m), 1,35-1,45 (4H, m), 1,60-1,78 (5H, m), 2,18-2,21 (5H, m), 2,69 (1H, m), 2,81-2,91 (5H, m), 4,16 (2H, q, $J=6,8\text{Hz}$), 4,61 (1H, d, $J=17,1\text{Hz}$), 4,85 (1H, d, $J=17,1\text{Hz}$), 6,22 (1H, q, $J=6,8\text{Hz}$), 7,11 (1H, d, $J=8,6\text{Hz}$), 7,23 (1H, s), 7,37 (1H, d, $J=8,3\text{Hz}$), 7,70 (1H, s), 7,73 (2H, s), 8,14 (2H, s)

Bước 3: Quy trình điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của este benzyl của axit trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5\text{-bis(triflometyl)phenyl]etyl}\}\{5-[2\text{-}(metylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl\}amino)metyl]-4\text{-(triflometyl)phenyl}\}(etyl)amino)metyl\}xyclohexyl\}$ axetic

Dưới điều kiện khí quyển argon, dung dịch chứa hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) có công thức (4) của axit trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5\text{-bis(triflometyl)phenyl]etyl}\}\{5-[2\text{-}(metylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl\}amino)metyl]-4\text{-(triflometyl)phenyl}\}(etyl)amino)metyl\}xyclohexyl\}$ axetic (744,1g, 0,95mol) thu được trong bước 2 trong dicloetan khan (11,6l) được bổ sung rượu benzylic (113,1g, 1,05mol), WSC·HCl (200,5g, 1,05mol) và DMAP (11,9g, 98mmol) trong điều kiện làm lạnh trên đá, và khuấy qua đêm hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung nước (10l) vào hỗn hợp phản ứng này, và chiết hỗn hợp này bằng cloroform (19l, 14l). Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước muối bão hòa (12l), làm khô bằng magie sulfat khan, và sau đó cô dưới áp

suất giảm, và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột (silicagel: 28g, dung môi phát hiện: heptan/etyl axetat = 6/1) để thu được hợp chất bán bất đối xứng có công thức (5) của este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (dầu màu vàng, 745,8g, hiệu suất: 90%).

Hợp chất bán bất đối xứng thu được có công thức (5) là hợp chất giàu chất đồng phân (S) theo cách giống như hợp chất bán bất đối xứng có công thức (4).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,87-0,95 (7H, m), 1,37 (1H, m), 1,43 (3H, d, $J=7,1\text{Hz}$), 1,65-1,77 (5H, m), 2,20 (2H, d, $J=6,8\text{Hz}$), 2,22 (3H, s), 2,66-2,71 (2H, m), 2,82-2,91 (4H, m), 4,15 (2H, t, $J=6,6\text{Hz}$), 4,62 (1H, d, $J=17,1\text{Hz}$), 4,85 (1H, d, $J=17,1\text{Hz}$), 5,10 (2H, s), 6,21 (1H, q, $J=7,1\text{Hz}$), 7,10 (1H, d, $J=8,3\text{Hz}$), 7,22 (1H, s), 7,28-7,38 (6H, m), 7,70 (1H, s), 7,73 (2H, s), 8,14 (2H, s)

Bước 4: Quy trình điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic

Dưới điều kiện khí quyển argon, dung dịch chứa hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) có công thức (5) của este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (745,8g, 0,87mol) thu được trong bước 3 trong 2-propanol (15,2l) được bổ sung tantan pentaclorua (31,3g, 87,3mmol) và dung dịch nước hydro peroxit 30%

(496ml, 4,38mol), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ. Dập tắt hỗn hợp phản ứng bằng dung dịch nước natri hydrosulfit bão hòa (3,1l), và bổ sung nước (15l), và chiết hỗn hợp này bằng cloroform (14l, 12l). Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước muối bão hòa (20l), làm khô bằng magie sulfat khan, và sau đó cô dưới áp suất giảm, và tinh chế cạn thu được bằng sắc ký cột (silicagel: 26kg, dung môi phát hiện: heptan/etyl axetat có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3/1 đến 2/1) để thu được hợp chất bán bất đối xứng có công thức (6) của este benzyl của axit trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5\text{-bis(triflometyl)phenyl]ethyl}\}\{5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl\}amino)methyl]-4-(triflometyl)phenyl\}(ethyl)amino)methyl\}xyclohexyl\}$ axetic (dạng vô định hình màu vàng, 619,5g, hiệu suất: 79%).

Hợp chất bán bất đối xứng thu được có công thức (6) là hợp chất giàu chất đồng phân (S) thu được theo cách giống như hợp chất bán bất đối xứng có công thức (4) và hợp chất bán bất đối xứng có công thức (5).

Phân tích HPLC không đối xứng: độ tinh khiết về mặt quang học: 67,7%ee (đỉnh chính: đỉnh thứ hai)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,87-0,96 (7H, m), 1,38 (1H, m), 1,45 (3H, d, $J=7,1\text{Hz}$), 1,65-1,80 (5H, m), 2,21 (2H, d, $J=6,6\text{Hz}$), 2,69 (1H, m), 2,81-2,91 (3H, m), 3,08 (3H, s), 3,44 (2H, t, $J=5,4\text{Hz}$), 4,44 (2H, t, $J=5,4\text{Hz}$), 4,64 (1H, d, $J=17,1\text{Hz}$), 4,86 (1H, d, $J=17,3\text{Hz}$), 5,10 (2H, s), 6,19 (1H, q, $J=6,9\text{Hz}$), 7,12 (1H, d, $J=8,3\text{Hz}$), 7,19 (1H, s), 7,30-7,39 (6H, m), 7,71 (1H, s), 7,72 (2H, s), 8,16 (2H, s)

Bước 5: Quy trình điều chế este benzyl của axit (S)-trans- $\{4-[(\{2-[(\{1-[3,5\text{-bis(triflometyl)phenyl]ethyl}\}\{5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-$

yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic
gần như tinh khiết về mặt quang học

Hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) có công thức (6) của este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic (111,7g, 123,7mmol, 67,7%ee) thu được trong bước 4 được hòa tan trong etanol (825ml), và bổ sung các hạt tinh thể được điều chế riêng rẽ (tinh thể raxemat được điều chế trong bước 7 được mô tả dưới đây, 2,0mg) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 20°C, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ này trong 21 giờ, và ở nhiệt độ 0°C trong 3 giờ. Tách kết tủa bằng cách lọc, và rửa bằng etanol đã làm lạnh (165ml), và sau đó cô dung dịch cái dưới áp suất giảm để thu được este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức (7) (dạng vô định hình màu vàng, 66,38g, hiệu suất: 59%).

Este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic có công thức (7) thu được được thu bằng cách tách các tinh thể giàu raxemat ra khỏi hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) có công thức (6) bằng cách lọc, và do đó, thu được chất đồng phân (S).

Phân tích HPLC không đối xứng: độ tinh khiết về mặt quang học >99%ee (đỉnh

chính: đỉnh thứ hai)

$[\alpha]_D^{20}$ -42,36 ($c = 1,0\%$ trọng lượng/thể tích, CHCl_3)

Độ tinh khiết về mặt quang học của các tinh thể giàu raxemat được tách bằng cách lọc là 22%ee như được xác định bằng phân tích HPLC không đối xứng (43,39g, hiệu suất: 39%).

Bước 6: Quy trình điều chế axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic gần như tinh khiết về mặt quang học

Dưới điều kiện khí quyển nitơ, bổ sung 10% Pd-C (ẩm, 3,4g) vào dung dịch chứa este benzyl của axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic có công thức (7) (34,2g, 37,88mmol, >99%ee) thu được trong bước 5 trong etanol (340ml) để thể hydro, và sau đó khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Lọc huyền phù phản ứng qua đệm xelit, và rửa bằng etanol (50ml), và cô dung dịch rửa dưới áp suất giảm để thu được axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic có công thức (III) gần như tinh khiết về mặt quang học (dạng vô định hình màu trắng, 31,78g, hiệu suất: 100%).

Hợp chất thu được là hợp chất quay trái như được thể hiện bằng sự quay riêng nêu dưới đây. Ngoài ra, do hợp chất thu được được thu nhận bằng cách khử bảo vệ gốc este của chất đồng phân este benzyl (S) có công thức (7), kết quả

thu được cũng là chất đồng phân (S).

Phân tích HPLC không đối xứng: độ tinh khiết về mặt quang học: >99%ee (đỉnh chính: đỉnh thứ hai)

$[\alpha]_D^{20}$ -46,68 ($c = 1,0$, CHCl_3)

IR (ATR) cm^{-1} : 2921, 1706, 1479, 1279, 1134

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,80-0,96 (7H, m), 1,38 (1H, m), 1,47 (3H, d, $J=7,1\text{Hz}$), 1,65-1,77 (5H, m), 2,19 (2H, d, $J=6,8\text{Hz}$), 2,72 (1H, m), 2,81-2,91 (3H, m), 3,08 (3H, s), 3,45 (2H, t, $J=5,2\text{Hz}$), 4,44 (2H, q, $J=5,4\text{Hz}$), 4,62 (1H, d, $J=17,1\text{Hz}$), 4,86 (1H, d, $J=17,4\text{Hz}$), 6,21 (1H, q, $J=7,1\text{Hz}$), 7,13 (1H, d, $J=8,3\text{Hz}$), 7,19 (1H, s), 7,38 (1H, d, $J=6,6\text{Hz}$), 7,71 (1H, s), 7,73 (2H, s), 8,15 (2H, s)

Bước 7: Quy trình điều chế các hạt tinh thể raxemat của este benzyl của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic

Bổ sung rượu benzylic (2,93g, 27,07mmol), DMAP (300mg, 2,46mmol) và WSC·HCl (5,19g, 27,07mmol) vào dung dịch chứa axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl}(ethylamino)methyl]cyclohexyl}acetic (hợp chất raxemat có công thức (I), 20g, 24,61mmol) được tổng hợp bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu patent 2 (công bố patent quốc tế WO2008/129951), ví dụ 45 trong diclofenac khan (200ml) dưới điều kiện làm lạnh trên đá, và làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ trong phòng, và khuấy trong 16 giờ. Bổ sung nước (100ml) vào hỗn hợp phản ứng này, và chiết hỗn hợp này bằng chloroform (500ml). Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước axit clohydric

2M (100ml) và dung dịch nước muối bão hòa (100ml), làm khô bằng magie sulfat khan, và sau đó cô dưới áp suất giảm, và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột (silica gel: 350g, dung môi phát hiện: N-hexan/etyl axetat có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3/1 đến 1/1) để thu được este benzyl của axit trans-4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (21,15g, hiệu suất: 95,2%) ở dạng vô định hình màu trắng.

Hòa tan este benzyl của axit trans-4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic ở dạng vô định hình màu trắng (7,9g) trong etanol (40ml), khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 15 giờ, và thu gom kết tủa thu được bằng cách lọc, rửa bằng etanol đã làm lạnh (20ml), và làm khô ở nhiệt độ 60°C trong 4 giờ dưới áp suất giảm để thu được tinh thể raxemat của este benzyl của axit trans-4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (bột tinh thể màu trắng, 6,98g, hiệu suất thu hồi: 88,4%).

Ví dụ 2: Nghiên cứu sự ảnh hưởng của hợp chất đồng phân (S) có công thức (III) đến lượng protein PCSK9 và lượng thụ thể LDL

Sự ảnh hưởng của hợp chất thử nghiệm đến lượng protein PCSK9 và lượng thụ thể LDL được nghiên cứu bằng cách bổ sung hợp chất thử nghiệm vào chủng tế bào ung thư gan của người, tế bào HepG2, và đo lượng protein PCSK9 và lượng thụ thể LDL (LDLR) bằng kỹ thuật thấm tách tây sau khi nuôi cấy trong 48 giờ.

Cụ thể là, tế bào HepG2 được cấy trên đĩa có 6 lỗ ở mật độ 5×10^5 tế bào/lỗ và cấy qua đêm, và hòa tan hợp chất thử nghiệm trong dimetyl sulfoxit (DMSO), hoặc chỉ bổ sung DMSO vào môi trường nuôi cấy với lượng gấp 1/1000 lần. Nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ trong tủ ủ CO_2 , bổ sung 100 μl dung dịch đệm RIPA (50mM Tris-HCl, pH=7,8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% natri deoxycholat, 0,1% SDS, chất ức chế proteinaza) vào môi trường này để phá vỡ tế bào, và chiết protein. Các protein chiết được ly tâm ở tốc độ 100000m/s², thu gom dịch nổi, và bổ sung dung dịch đệm mẫu SDS (60mM Tris-HCl, pH=6,8, 2% SDS, 10% glyxerol, 3% mercaptoetanol), và tách hỗn hợp bằng SDS-PAGE (điện di trên gel SDS-polyacrylamit) nhờ 8% acrylamit gel. Sau khi hoàn tất quá trình tách, protein được cố định trên màng nitroxenluloza bằng cách sử dụng hệ chuyển gel iBlot (Invitrogen), và được phong bế bằng cách sử dụng Block Ace (DS Pharma Biomedical, Catalog No. UK-B 80).

Việc phát hiện protein PCSK9, LDLR, và protein β -actin, và đo lượng của chúng được tiến hành bằng cách đánh dấu protein trên màng nhờ kháng PCSK9 (Cayman, Catalog No. 1000718), kháng LDLR (BioVision, Catalog No. 3839-100), và kháng β -Actin (Sigma, Catalog No. A5316), tương ứng, làm kháng thể chính, và kháng IgG-HRP thỏ (Sigma, Catalog No. A0545) hoặc kháng IgG-HRP chuột (Sigma, Catalog No. A4416) làm kháng thể phụ, cho chất phát quang hóa học (cơ chất của HRP) phản ứng với kháng thể phụ trên màng, và sau đó đánh giá cường độ tín hiệu nhờ thiết bị phân tích hình ảnh Lumino LAS-3000 (Fuji Photo Film). Cường độ tín hiệu thu được được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh, Science Lab 2002 Multi Gauge

(Fuji Photo Film).

Các trị số đo được thu được về lượng protein PCSK9 và lượng thụ thể LDL được hiệu chỉnh giữa các trị số thu được ở mẫu được bổ sung hợp chất thử nghiệm và mẫu đối chứng (mẫu chỉ được bổ sung DMSO) sử dụng lượng protein β -actin làm chỉ số. Lượng protein PCSK9 đã hiệu chỉnh và lượng thụ thể LDL của mẫu bổ sung hợp chất thử nghiệm được thể hiện bằng trị số tương đối dựa trên lượng protein PCSK9 và lượng thụ thể LDL của mẫu đối chứng, tương ứng, mà được coi là 1.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Các hợp chất sau được sử dụng làm hợp chất thử nghiệm.

1: axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflormetyl)phenyl]etyl){5-[2-(methylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflormetyl)phenyl](etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (hợp chất đồng phân (S) có công thức (III))

Hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) (độ tinh khiết về mặt quang học: >99%ee) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là 10 μ M.

2: axit (R)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-Bis(triflormetyl)phenyl]etyl){5-[2-(methylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflormetyl)phenyl](etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (hợp chất đồng phân (R) có công thức (II))

Hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) (độ tinh khiết về mặt quang học: $\geq$ 98%ee) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là 10 μ M.

3: axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflormetyl)phenyl]etyl){5-[2-(methylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-

(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (hợp chất raxemat có công thức (I))

Hợp chất raxemat có công thức (I) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối là 10 μ M.

[bảng 1]

Hợp chất thử nghiệm	Liều (μ M, nồng độ trong môi trường nuôi cấy)	Lượng protein PCSK9 (trị số tương đối dựa trên trị số của mẫu đối chứng được coi là 1)	Lượng thụ thể LDL (trị số tương đối dựa trên trị số của mẫu đối chứng được coi là 1)
Hợp chất đồng phân (S) có công thức (III)	10	0,28	1,73
Hợp chất đồng phân (R) có công thức (II)	10	1,05	0,93
Hợp chất raxemat có công thức (I)	10	0,68	0,73

Như đã được hiểu rõ từ các kết quả nêu trong bảng 1, hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) làm giảm đáng kể lượng protein PCSK9 và làm tăng lượng thụ thể LDL so với mẫu đối chứng, trong khi đó hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) và hợp chất raxemat có công thức (I) hầu như không có các tác dụng này. Cụ thể là, lượng thụ thể LDL được làm tăng đáng kể chỉ bằng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) so với mẫu đối chứng.

Từ các kết quả thử nghiệm nêu trên, đã nhận thấy rằng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 và tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL.

Ngoài ra, mặc dù sáng chế không bị ràng buộc bởi đánh giá sau, nhưng được cho là, vì hợp chất raxemat có công thức (I) hầu như không có tác dụng

làm giảm lượng protein PCSK9 và hoàn toàn không có tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL mặc dù thực tế là hợp chất này chứa 50% hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III), hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) là thành phần cấu tạo của hợp chất raxemat có công thức (I) ức chế sự biểu hiện các tác dụng của hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) trong hợp chất raxemat có công thức (I). Ngoài ra, còn cho rằng tốt hơn nếu tăng độ tinh khiết về mặt quang học của hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) để làm giảm lượng hợp chất đồng phân (R) có công thức (II) đặc biệt để làm tăng tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL.

Ví dụ 3: Nghiên cứu sự ảnh hưởng của hợp chất đồng phân (S) có công thức (III) đến sự biểu hiện ARN thông tin của PCSK9

Để nghiên cứu cơ chế của tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 nêu trong ví dụ 2 nêu trên, hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào tế bào HepG2, và mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 được đánh giá bằng phương pháp PCR thời gian thực định lượng sau khi nuôi cấy trong 24 giờ.

Cụ thể là, các tế bào HepG2 được cấy vào đĩa có 24 lỗ ở mật độ 2×10^5 tế bào/lỗ và nuôi cấy qua đêm, và sau đó hòa tan hợp chất thử nghiệm trong dimethyl sulfoxit (DMSO), hoặc chỉ bổ sung DMSO vào môi trường nuôi cấy với lượng gấp 1/1000 lần. Nuôi cấy tế bào này ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ trong tủ ủ CO₂, và sau đó bổ sung 500μl ISOGEN (NIPPON GENE, Catalog No. 31-02501), và chiết ARN tổng số. ADN bổ trợ được tổng hợp từ ARN tổng số đã chiết bằng kit phiên mã ngược ADN bổ trợ hiệu quả cao (AppliedBiosystems, Catalog No. 4368813). Mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 của người được đánh giá bằng PCR thời gian thực định lượng nhờ các đoạn mồi đặc hiệu

với PCSK9 của người (Kourimate S.etal., J. Biol. Chem., Vol.283, p9666), và Fast SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystems, Catalog No. 4385614). Hệ thống PCR thời gian thực nhanh 7900HT được sử dụng làm thiết bị đo.

Các trị số đo được thu được của mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 được điều chỉnh giữa các trị số thu được của các mẫu bổ sung hợp chất thử nghiệm (3 mẫu) và mẫu đối chứng (mẫu chỉ được bổ sung DMSO, 3 mẫu) sử dụng mức biểu hiện ARN thông tin của β -actin làm chỉ số. Mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 đã hiệu chỉnh của các mẫu bổ sung hợp chất thử nghiệm được thể hiện bằng trị số tương đối (giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn) dựa trên trị số trung bình của mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 của các mẫu đối chứng, mà được coi là 1.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Hợp chất sau được sử dụng làm hợp chất thử nghiệm.

1: axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl](ethyl)amino)methyl}cyclohexyl}acetic (hợp chất đồng phân (S) có công thức (III))

Hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) (độ tinh khiết về mặt quang học: >99%ee) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối bằng 10 μ M.

[Bảng 2]

Hợp chất thử nghiệm	Liều (μ M, nồng độ trong môi trường nuôi cấy)	Mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 (trị số tương đối dựa trên trị số trung bình của mẫu đối chứng được coi là 1)
---------------------	---	--

Hợp chất đồng phân (S) (III)	10	$0,18 \pm 0,13$
---------------------------------	----	-----------------

Từ kết quả nêu trong bảng 2, nhận thấy rằng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) làm giảm đáng kể mức biểu hiện ARN thông tin của PCSK9 so với mẫu đối chứng.

Do đó, đã được cho là ít nhất một phần tác dụng làm giảm lượng protein PCSK9 của hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) được bộc lộ trong ví dụ 2 được dựa trên tác dụng ức chế sự biểu hiện gen PCSK9, và hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có tác dụng ức chế tổng hợp protein PCSK9.

Ví dụ 4: Nghiên cứu tác dụng làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu của hợp chất đồng phân (S) có công thức (III)

Tạo huyền phù axit (S)-trans- $\{4-[(2-[(1-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl)\{5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl\}amino)methyl]-4-(trifluoromethyl)phenyl\}(ethylamino)methyl\}cyclohexyl\}$ axetic (hợp chất đồng phân (S) có công thức (III)), độ tinh khiết về mặt quang học: >99%ee) trong dung dịch 0,5% methylxenuloza, và cho chuột đồng bình thường (chuột đồng đực Syrian) sử dụng qua đường miệng lặp lại một lần một ngày trong 14 ngày bằng cách sử dụng mẫu dò kim loại. Bốn giờ sau khi sử dụng lần cuối, máu được lấy ra, và huyết tương được thu gom. Lipoprotein trong huyết tương được phân tích bằng cách đánh giá tự động nhờ hệ thống HPLC dựa trên phương pháp sau đánh dấu theo phương pháp được mô tả trong tài liệu J.Lipid.Res., 43, p805-814. Đặc biệt là, 15 μ l mẫu huyết tương được pha loãng 10 lần bằng dung dịch đệm PBS chứa 1mM EDTA, và 80 μ l mẫu đã pha loãng được tiêm vào cột lọc gel (cột Superose 6 (cỡ cột: 10x300mm), GE Healthcare Bioscience) được nối với hệ HPLC (thiết bị nạp chất lỏng: hệ thống Shimadzu

LC-20A, Shimadzu). Tiến hành tách ở tốc độ dòng là 0,5ml/phút và nhiệt độ cột là 40°C bằng cách sử dụng PBS chứa 1mM EDTA làm dung dịch đệm chạy. Chất đánh giá lượng cholesterol (thử nghiệm Wako Cholesterol E, Wako Pure Chemical Industries) được trộn với chất rửa giải từ cột ở tốc độ dòng bằng 0,25ml/phút, và phản ứng này được thực hiện ở nhiệt độ 40°C trong ống ruột gà phản ứng (0,5mm x 15m) có nạp chất rửa giải. Cholesterol trong dịch rửa giải thu được từ ống ruột gà phản ứng được phát hiện ở bước sóng bằng 600nm. Tỷ lệ diện tích của phân đoạn LDL dựa trên tổng diện tích đỉnh thu được của cholesterol được tính toán, và tổng lượng cholesterol được xác định trước bằng cách lấy trị số của thử nghiệm Wako Cholesterol E nhân với tỷ lệ diện tích của phân đoạn LDL để tính toán lượng cholesterol LDL.

Sáu con chuột đồng bình thường được sử dụng cho mỗi nhóm đối chứng (nhóm sử dụng dung dịch 0,5% metylxenluloza) và nhóm sử dụng hợp chất thử nghiệm (10mg/kg thể trọng và 30mg/kg thể trọng của nhóm sử dụng hợp chất đồng phân (S) có công thức (III)). Chia các con chuột đồng này thành các nhóm trước dựa vào tổng trị số cholesterol trong huyết tương.

Lượng cholesterol LDL trong huyết tương của các nhóm (LDL-C, mg/dl) được thể hiện trong bảng 3. Ký hiệu * và *** trong bảng 3 có nghĩa là có sự chênh lệch đáng kể ở mức có ý nghĩa là 5% hoặc nhỏ hơn ($p < 0,05$) và mức có ý nghĩa là 0,1% hoặc nhỏ hơn ($p < 0,001$), tương ứng như được xác định bằng kiểm định so sánh nhiều nhóm (kiểm định so sánh nhiều nhóm của Dunnett) được thực hiện giữa nhóm đối chứng và mỗi nhóm trong số các nhóm sử dụng hợp chất thử nghiệm. Hơn thế nữa, tỷ lệ làm giảm lượng cholesterol LDL của nhóm sử dụng hợp chất thử nghiệm dựa trên nhóm đối chứng được tính toán

theo công thức 1 dưới đây là tỷ lệ làm giảm cholesterol LDL, và được thể hiện bằng phần trăm.

Tỷ lệ làm giảm cholesterol LDL (%) = [(lượng cholesterol LDL trung bình của nhóm đối chứng – lượng cholesterol LDL trung bình của nhóm sử dụng hợp chất)/lượng cholesterol LDL trung bình của nhóm đối chứng] x100 (công thức 1)

[Bảng 3]

Hợp chất	Liều (mg/kg)	Lượng cholesterol LDL trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (mg/dl)	Tỷ lệ làm giảm lượng cholesterol LDL (%)
Đối chứng	-	50 $\pm$ 3,0	-
Hợp chất đồng phân (S) có công thức (III)	10	40 $\pm$ 2,6*	20,0
	30	31 $\pm$ 2,6***	38,0

Từ kết quả nêu trong bảng 3, nhận thấy rằng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có tác dụng làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu tốt hơn.

Từ các kết quả thử nghiệm nêu trên, cũng nhận thấy rằng hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) là hữu dụng làm hoạt chất của thuốc có tác dụng làm giảm lượng LDL trong máu và tác dụng tương tự.

Ví dụ 5: Nghiên cứu tác dụng của hợp chất raxemat có công thức (I) và hợp chất tương tự đến sự biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza

Hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào tế bào HepG2 và nuôi cấy tế bào này trong 8 giờ, và sau đó mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza được đánh giá bằng PCR thời gian thực định lượng.

Cụ thể là, các tế bào HepG2 được cấy vào đĩa có 24 lỗ ở mật độ 2×10^5 tế bào/lỗ và nuôi cấy qua đêm, và sau đó hợp chất thử nghiệm được hòa tan

trong dimethyl sulfoxit (DMSO), hoặc chỉ DMSO được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với lượng gấp 1/1000 lần. Nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ 37°C trong 8 giờ trong tủ ủ CO₂, và sau đó bổ sung 500µl ISOGEN (NIPPON GENE, Catalog No. 31-02501), và chiết ARN tổng số. Tổng hợp ADN bổ trợ từ ARN tổng số đã chiết bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ADN bổ trợ hiệu quả cao (AppliedBiosystems, Catalog No. 4368813). Mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza của người được đánh giá bằng PCR thời gian thực định lượng nhờ cặp mồi sau đây: 5'-GGTGTTC AAGGAGCATGCAAAG-3' và 5'-TGACAAGATGTCCTGCTGCCA-3' đặc hiệu với HMG-CoA reductaza của người, và Fast SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystems, Catalog No. 4385614). Hệ thống PCR thời gian thực nhanh 7900HT được sử dụng làm thiết bị đánh giá.

Trị số đo được thu được của mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza được hiệu chỉnh giữa các trị số thu được của các mẫu bổ sung hợp chất thử nghiệm (3 mẫu đối với mỗi hợp chất) và các mẫu đối chứng (mẫu chỉ được bổ sung DMSO, 3 mẫu) sử dụng mức biểu hiện ARN thông tin của β -actin làm chỉ số. Mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza đã hiệu chỉnh của mẫu bổ sung hợp chất thử nghiệm được thể hiện bằng trị số tương đối (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) dựa trên giá trị trung bình của mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza của các mẫu đối chứng, mà được coi là 1.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 4.

Các hợp chất dưới đây được sử dụng làm hợp chất thử nghiệm.

1: axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethyl){5-[2-(methylsulfonyl)ethoxy]pyrimidin-2-yl}amino)methyl]-4-

(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (hợp chất raxemat có công thức (I))

Hợp chất raxemat có công thức (I) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối bằng 10 μ M.

2: axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(methylthio)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic (hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44)

Hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cuối bằng 10 μ M.

[Bảng 4]

Hợp chất thử nghiệm	Liều (μ M, nồng độ trong môi trường nuôi cấy)	Mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza (trị số tương đối dựa trên trị số trung bình của mẫu đối chứng được coi là 1)
Hợp chất raxemat có công thức (I)	10	0,37 $\pm$ 0,02
Hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44	10	0,25 $\pm$ 0,03

Từ các kết quả nêu trong bảng 4, đã nhận thấy rằng cả hợp chất raxemat có công thức (I) và hợp chất được mô tả trong tài liệu patent 2, ví dụ 44 đều làm giảm đáng kể mức biểu hiện ARN thông tin của HMG-CoA reductaza so với mẫu đối chứng.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Hợp chất đồng phân-(S) có công thức (III) có tác dụng làm giảm lượng

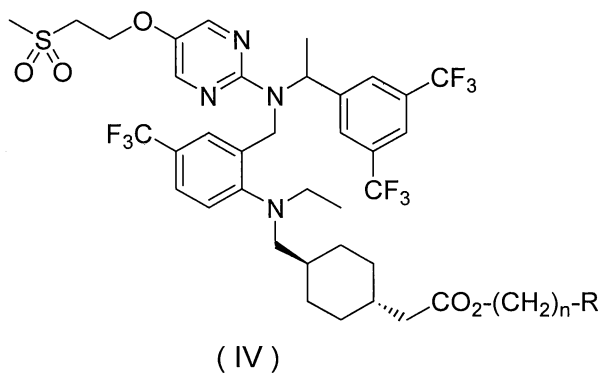
protein PCSK9, và tác dụng làm tăng lượng thụ thể LDL, và có tác dụng làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu tốt hơn. Do đó, hợp chất này có thể được sử dụng, ví dụ, làm hoạt chất của thuốc để làm giảm lượng cholesterol LDL trong máu, và tác dụng tương tự, và do đó có thể được sử dụng trong công nghiệp dược.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic gần như tinh khiết về mặt quang học, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, trong đó hợp chất này có độ tinh khiết về mặt quang học bằng 90%ee hoặc cao hơn.
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là chất đồng phân đối ảnh quay trái của axit trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó.
3. Hợp chất hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hợp chất này có độ tinh khiết về mặt quang học nằm trong khoảng từ 95 đến 100%ee.
4. Hợp chất hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hợp chất này có độ tinh khiết về mặt quang học bằng 99%ee hoặc cao hơn.
5. Thuốc chứa hợp chất, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 làm hoạt chất.
6. Phương pháp điều chế axit (S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-bis(triflometyl)phenyl]etyl){5-[2-(metylsulfonyl)etoxy]pyrimidin-2-yl}amino)metyl]-4-(triflometyl)phenyl}(etyl)amino)metyl]xyclohexyl}axetic gần như tinh khiết về mặt quang học, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, trong đó hợp chất này có độ tinh khiết về mặt quang học bằng 90%ee hoặc cao hơn, trong đó phương pháp này bao gồm bước loại các tinh thể giàu raxemat ra

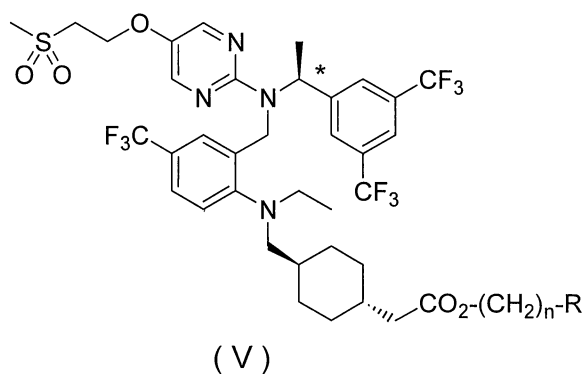
khởi hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức chung (IV) dưới đây:

[công thức 1]



(trong công thức này, R là nhóm C₆₋₁₀ aryl mà có thể có phần tử thế, hoặc nhóm heteroaryl có từ 5 đến 10 cạnh mà có thể có phần tử thế, và n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6) bằng phương pháp kết tinh ưu tiên trong dung môi để thu được hợp chất gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức chung (V) dưới đây:

[công thức 2]



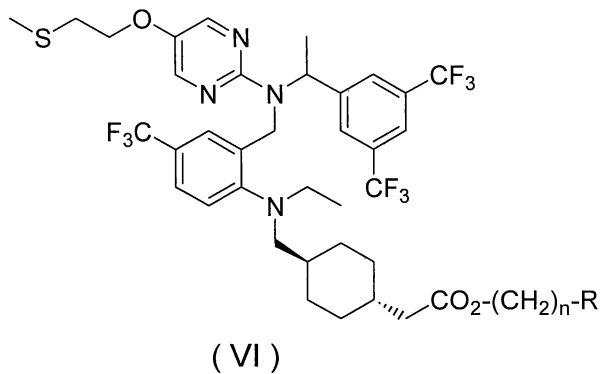
(trong công thức này, R và n có nghĩa như nêu trên).

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó phương pháp này bao gồm bước loại nhóm $-(CH_2)_n-R$ ra khỏi hợp chất có công thức chung (V).

8. Phương pháp theo điểm 6 hoặc 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm

bước cho hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức chung (VI) dưới đây:

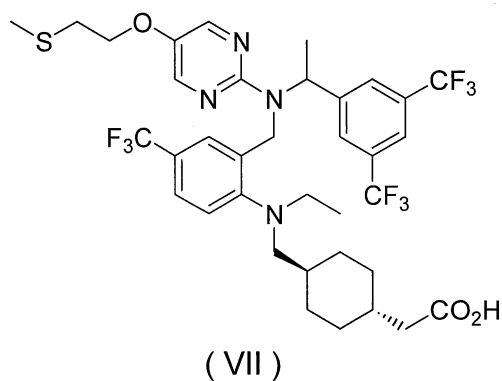
[công thức 3]



(trong công thức này, R và n có nghĩa như nêu trên) phản ứng với chất oxy hóa trong dung môi để điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức chung (IV).

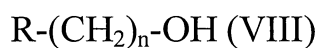
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức (VII) dưới đây:

[công thức 4]



phản ứng với hợp chất có công thức chung (VIII) dưới đây

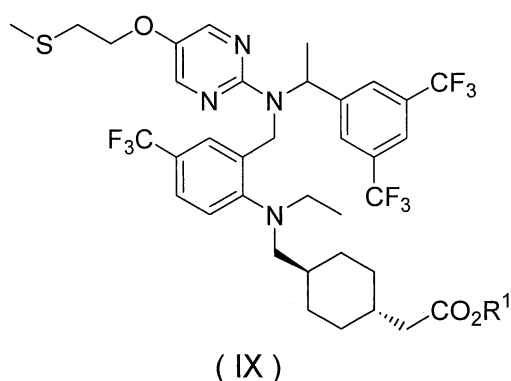
[công thức 5]



(trong công thức này, R và n có nghĩa như đã nêu trên) trong dung môi khi có mặt chất xúc tác để điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất được thể hiện bằng công thức chung (VI).

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thủy phân hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức chung (IX) dưới đây:

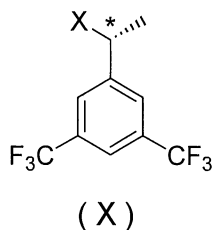
[công thức 6]



(trong công thức này, R¹ là nhóm C₁₋₆ alkyl) trong dung môi khi có mặt bazơ để điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức (VII).

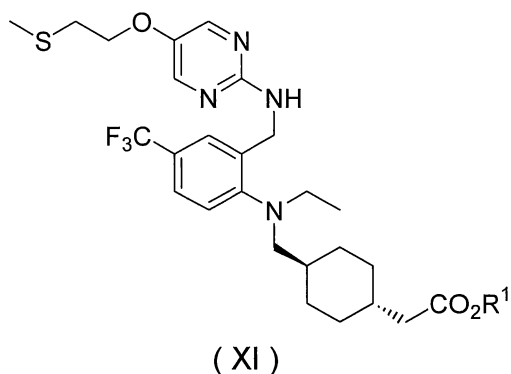
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức chung (X) dưới đây:

[công thức 7]



(trong công thức này, X là nguyên tử halogen), và hợp chất có công thức chung (XI) dưới đây:

[công thức 8]



(trong công thức này, R^1 có nghĩa như đã nêu trên) phản ứng với nhau trong dung môi khi có mặt bazơ để điều chế hợp chất bán bất đối xứng giàu chất đồng phân (S) của hợp chất có công thức chung (IX).

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước halogen hóa (S)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethanol khi có mặt chất halogen hóa để điều chế hợp chất có công thức chung (X).

13. Hợp chất bán bất đối xứng có công thức chung (IV) nêu trong điểm 6, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, trong đó hợp chất này chứa chất đồng phân (S) có độ tinh khiết về mặt quang học không thấp hơn 10%ee và thấp hơn 90%ee.

14. Hợp chất gần như tinh khiết về mặt quang học có công thức chung (V) nêu trong điểm 6, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó, trong đó hợp chất này có độ tinh khiết về mặt quang học bằng 90%ee hoặc cao hơn.

15. Hợp chất, hoặc muối của nó, hoặc solvat của nó theo điểm 13 hoặc 14, trong đó R là nhóm phenyl, và n là 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Kowa Company Ltd.

<120> Hợp chất dibenzylamin quay quang, dược phẩm chứa hợp chất này và phương pháp điều chế hợp chất này

<130> 111195M

<150> JP 2010-128585

<151> 2010-06-04

<150> JP 2010-218299

<151> 2010-09-29

<160> 2

<170> Patent phiên bản 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> nhân tạo

<400> 1

gggtgtcaag gagcatgcaa ag

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> nhân tạo

<400> 2

tgacaagatg tcctgctgcc a