



(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) 
1-0021098

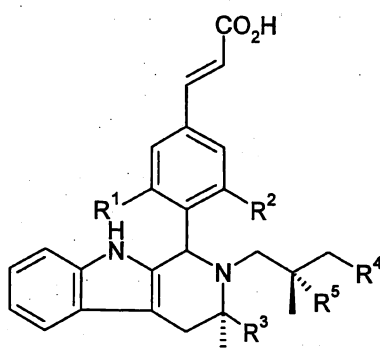
(51)⁷ C07D 471/04, A61K 31/437, A61P
35/00

(13) B

-
- (21) 1-2015-04941 (22) 27.05.2014
(86) PCT/GB2014/051607 27.05.2014 (87) WO2014/191726 04.12.2014
(30) 61/827,951 28.05.2013 US
61/915,685 13.12.2013 US
(45) 25.06.2019 375 (43) 25.03.2016 336
(73) ASTRAZENECA AB (SE)
SE-151 85 Sodertalje, Sweden
(72) AKHTAR, Nadim (GB), BRADBURY, Robert, Hugh (GB), BUTTAR, David (GB),
CURRIE, Gordon, Stuart (GB), DE SAVI, Christopher (AU), DONALD, Craig,
Samuel (GB), NORMAN, Richard, Albert (GB), OSBORNE, Matthew (GB),
RABOW, Alfred, Arthur (US), REDFEARN, Heather, Marie (GB), WILLIAMS,
Helen, Elizabeth (GB), YAVARI, Neda (GB)
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

(54) HỢP CHẤT INDOL, DƯỢC PHẨM VÀ CHẾ PHẨM KẾT HỢP CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó, trong đó từ R^1 đến R^5 được định nghĩa như trong bản mô tả; dược phẩm chứa hợp chất này và chế phẩm kết hợp chứa hợp chất này.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất indol, hoặc muối được dụng của nó, có hoạt tính chống ung thư, do đó hữu ích trong phương pháp điều trị bệnh cho người và động vật. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này, được phẩm chứa hợp chất này và mô tả việc sử dụng hợp chất này trong phương pháp điều trị bệnh, ví dụ trong sản xuất thuốc dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, bao gồm cả việc sử dụng hợp chất này trong phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư. Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất indol có tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc của thụ thể estrogen.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể estrogen alpha ($ER\alpha$, ESR1, NR3A) và thụ thể estrogen beta ($ER\beta$, ESR2, NR3b) là thụ thể hormon steroid thuộc họ thụ thể nhân kích cỡ lớn. Tương tự với cấu trúc của toàn bộ các thụ thể nhân, $ER\alpha$ chứa sáu vùng chức năng (tức là các vùng từ A đến F) (Dahlman-Wright, et al, *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58:773-781) và được phân loại là yếu tố phiên mã phụ thuộc phối tử do sau khi liên kết với phối tử đặc hiệu là hormon sinh dục nữ steroid 17 β estradiol (E2), thì phức hợp này sẽ gắn kết với trình tự bộ gen có tên là các yếu tố thụ thể estrogen (ERE), và tương tác với yếu tố đồng điều hòa để điều biến phiên mã gen đích. Gen $ER\alpha$ nằm ở nhiễm sắc thể 6q25.1 và mã hóa protein 595AA, và nhiều dạng tương đồng có thể được tạo ra do có các vị trí khởi đầu dịch mã khác nhau và các kiểu cắt nối khác nhau. Ngoài vùng gắn kết ADN (vùng C) và vùng gắn kết phối tử (vùng E), thì thụ thể này còn chứa vùng đầu N (vùng A/B), vùng bản lề (vùng D) liên kết vùng C, và vùng E và vùng đầu C (vùng F). Mặc dù vùng C và vùng E của $ER\alpha$ và $ER\beta$ có độ bảo thủ tương đối cao (độ tương đồng axit amin lần lượt là 96% và 55%), thì độ bảo thủ của vùng A/B, vùng D và vùng F lại thấp (độ tương đồng axit amin nhỏ hơn 30%). Cả hai thụ thể này tham gia vào quá trình điều hòa và phát triển hệ sinh dục nữ và đóng vai trò quan trọng trong hệ thần kinh trung ương, hệ mạch và trong chuyển hóa xương. Tác dụng của ER đối với bộ gen xuất hiện trong nhân của tế bào khi thụ thể này gắn kết trực tiếp (chu trình hoạt hóa trực tiếp hoặc chu trình đặc hiệu) hoặc gián tiếp (chu trình hoạt hóa gián tiếp hoặc chu trình không đặc hiệu) với ERE. Trong sự có mặt của

phối tử, ER được liên kết với protein sốc nhiệt Hsp90 và Hsp70, và thể chaperon đã liên kết làm ổn định vùng gắn kết phối tử (LBD) làm cho nó dễ tiếp cận được với phối tử. ER đã gắn kết phối tử phân tách khỏi protein sốc nhiệt dẫn đến làm biến đổi hình dạng của thụ thể, điều này cho phép dimer hóa, gắn kết ADN, tương tác với yếu tố đồng hoạt hóa hoặc đồng thụ thể và điều hòa biểu hiện gen đích. Trong chu trình không đặc hiệu, AP-1 và Sp-1 là các trình tự ADN điều hòa thay thế được sử dụng bởi cả hai dạng tương đồng của thụ thể để điều hòa biểu hiện gen. Trong trường hợp này, ER không tương tác trực tiếp với ADN mà thông qua việc liên kết với các yếu tố phiên mã gắn kết ADN khác, ví dụ c-Jun hoặc c-Fos (Kushner et al, *Pure Applied Chemistry* 2003, 75:1757-1769). Cơ chế ảnh hưởng của ER đến phiên mã gen chưa được hiểu rõ nhưng có thể được điều hòa bởi nhiều yếu tố ở nhân được huy động bởi thụ thể gắn kết ADN. Quá trình hoạt hóa yếu tố đồng điều hòa được điều biến chủ yếu bởi hai protein bề mặt AF2 và AF1 lần lượt nằm ở vùng E và vùng A/B. AF1 được điều hòa bởi các yếu tố tăng trưởng và hoạt tính của nó phụ thuộc vào môi trường tế bào và vùng khởi đầu, trong khi đó hoạt tính của AF2 hoàn toàn phụ thuộc vào hoạt tính gắn kết phối tử. Mặc dù hai vùng này có thể hoạt động độc lập, nhưng hoạt tính phiên mã ER tối đa lại đạt được thông qua tương tác hiệp đồng nhờ hai vùng này (Tzukerman, et al, *Mol. Endocrinology*, 1994, 8:21-30). Mặc dù ER được xem là yếu tố phiên mã, nhưng thụ thể này cũng có thể hoạt động thông qua cơ chế không qua gen như được thể hiện bởi tác dụng nhanh của ER ở mô sau khi hoạt hóa E2 trong một khoảng thời gian tức là quá nhanh để tác động qua gen. Hiện vẫn chưa rõ liệu các thụ thể hoạt hóa nhanh estrogen là các ER tương tự ở nhân hay các thụ thể steroid ghép cặp protein G riêng biệt (Warner, et al, *Steroids* 2006 71:91-95), nhưng nhiều chu trình cảm ứng bởi E2 đã được xác định, ví dụ chu trình MAPK/ERK, quá trình hoạt hóa nitơ oxit nội mô synthaza và chu trình PI3K/Akt. Ngoài các chu trình phụ thuộc phối tử, ER α đã được kiểm chứng là có hoạt tính không phụ thuộc phối tử thông qua AF-1 mà có liên quan với quá trình kích thích MAPK thông qua quá trình truyền tín hiệu yếu tố tăng trưởng, ví dụ yếu tố tăng trưởng tương tự insulin 1 (IGF-1) và yếu tố tăng trưởng biểu bì (ví dụ yếu tố F). Hoạt tính của AF-1 phụ thuộc vào quá trình phosphoryl hóa Ser118 và ví dụ về mối liên quan giữa ER và quá trình truyền tín hiệu yếu tố tăng trưởng là quá trình phosphoryl hóa Ser 118 bởi MAPK khi đáp ứng với các yếu tố tăng trưởng, như IGF-1 và EGF (Kato, et al, *Science*, 1995, 270:1491-1494).

Nhiều hợp chất có cấu trúc riêng biệt đã được kiểm chứng là có khả năng gắn kết với ER. Một số hợp chất, như phối tử nội sinh E2, có tác dụng chủ vận thụ thể, trong khi đó các hợp chất khác ức chế hoàn toàn gắn kết E2 và có tác dụng đối kháng thụ thể. Các hợp chất này có thể được chia thành 2 lớp phụ thuộc vào chức năng của chúng. Chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM), như tamoxifen có cả hoạt tính dưới dạng chất chủ vận lẫn chất đối kháng thụ thể phụ thuộc vào thuộc tính tế bào và gen khởi đầu cũng như dạng tương đồng ER hướng đích, ví dụ tamoxifen có hoạt tính như chất đối kháng ở vú nhưng lại có hoạt tính như chất chủ vận một phần ở xương, hệ mạch và tử cung. Toàn bộ các SERM có hoạt tính như chất đối kháng AF2 và đặc tính chủ vận một phần của chúng đạt được thông qua AF1. Ví dụ về nhóm thứ hai là fulvestrant được phân loại là chất đối kháng hoàn toàn và có khả năng phong bế hoạt tính estrogen thông qua việc ức chế hoàn toàn các vùng AF1 và AF2 thông qua việc cảm ứng biến đổi hình dạng đặc hiệu ở vùng gắn kết phối tử (LBD) khi gắn kết với hợp chất dẫn đến ức chế hoàn toàn tương tác giữa sợi xoắn kép 12 và phần còn lại của LBD, phong bế hoạt hóa đồng yếu tố (Wakeling, et al, *Cancer Res*, 1991, 51:3867-3873; Pike, et al, *Structure*, 2001, 9:145-153).

Mức nội bào của ER α được điều hòa ức chế biểu hiện trong sự có mặt của E2 thông qua chu trình ubiquitin/proteosom (Ub/26S). Quá trình polyubiquitin hóa ER α đã gắn kết phối tử được xúc tác bởi ít nhất ba enzym bao gồm enzym hoạt hóa ubiquitin E1 được liên hợp bởi E2 với gốc lysin thông qua liên kết isopeptit bởi E3 ubiquitin ligaza, sau đó polyubiquitin ER α được liên kết trực tiếp với proteosom để phân hủy. Mặc dù quá trình điều hòa phiên mã phụ thuộc ER và quá trình phân hủy nhờ proteosom của ER có mối tương quan với nhau (Lonard, et al, *Mol. Cell*, 2000 5:939-948), nhưng bản thân quá trình phiên mã không cần thiết để phân hủy ER α và quá trình lắp ráp phức hợp hoạt hóa phiên mã là đủ để hướng đích đến ER α để phân hủy bằng proteosom ở nhân. Quá trình phân hủy được cảm ứng bởi E2 này là cần thiết cho hoạt tính của nó để hoạt hóa nhanh quá trình phiên mã khi đáp ứng với các yêu cầu để tăng sinh, biệt hóa và chuyển hóa tế bào (Stenoien, et al, *mol. Cell Biol*, 2001, 21:4404-4412). Fulvestrant cũng được phân loại là chất điều hòa ức chế biểu hiện thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor down-regulator - SERD), một số chất đối kháng cũng có tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện nhanh ER α thông qua chu trình proteosom 26S. Ngược lại SERM như

tamoxifen có thể làm tăng hàm lượng ER α mặc dù cơ chế tác động đến quá trình phiên mã là giống như SERD.

Khoảng 70% người bệnh ung thư vú biểu hiện ER và/hoặc thụ thể progesteron tức là tế bào khối u ung thư vú phụ thuộc vào hormon để sinh trưởng. Các bệnh ung thư khác như bệnh ung thư buồng trứng và bệnh ung thư nội mạc tử cung cũng được cho là phụ thuộc vào quá trình truyền tín hiệu ER α để sinh trưởng. Các đối tượng bị bệnh này có thể được điều trị bằng cách ức chế truyền tín hiệu ER bằng cách đối kháng phối tử gắn kết với ER, ví dụ tamoxifen được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú biểu hiện ER giai đoạn sớm và tiến triển ở cả trước và sau mãn kinh; đối kháng và điều hòa ức chế biểu hiện ER α , ví dụ fulvestrant được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú ở phụ nữ đã tiến triển mặc dù đã điều trị bằng tamoxifen hoặc chất ức chế aromataza; hoặc ức chế tổng hợp estrogen, ví dụ chất ức chế aromataza được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú biểu hiện ER giai đoạn sớm và tiến triển. Mặc dù các liệu pháp này rất hữu hiệu để điều trị bệnh ung thư vú, nhưng một lượng đáng kể đối tượng bị bệnh có khối u biểu hiện ER đã kháng lại liệu pháp ER hiện nay hoặc phát triển khả năng kháng các liệu pháp này theo thời gian. Một số cơ chế khác biệt đã được phát hiện để giải thích khả năng kháng tamoxifen khi điều trị lần đầu, trong đó chủ yếu liên quan đến sự biến đổi tác dụng đối kháng của tamoxifen thành tác dụng chủ vận, thông qua ái lực thấp của một số đồng yếu tố gắn kết với phức hợp tamoxifen-ER α được điều chỉnh bằng cách biểu hiện quá mức các đồng yếu tố này, hoặc thông qua sự hình thành các vị trí cấp hai mà tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác của phức hợp tamoxifen-ER α với các đồng yếu tố thường không gắn kết với phức hợp này. Do đó, tính kháng thuốc xuất hiện là do sự phát triển quá mức của các tế bào biểu hiện đồng yếu tố đặc hiệu mà điều khiển hoạt tính của phức hợp tamoxifen-ER α . Ngoài ra, tính kháng thuốc xuất hiện cũng có thể do các quá trình truyền tín hiệu yếu tố tăng trưởng khác mà hoạt hóa trực tiếp thụ thể ER hoặc các đồng yếu tố để điều khiển sự tăng sinh tế bào không phụ thuộc vào quá trình truyền tín hiệu phối tử.

Gần đây, các đột biến của ESR1 đã được xác định là cơ chế kháng khả thi ở các mẫu khối u lấy từ bệnh nhân ung thư di căn biểu hiện ER và mô hình khối u ghép ngoại lai lấy từ bệnh nhân (PDX) ở tần suất nằm trong khoảng từ 17% đến 25%. Các đột biến này xuất hiện chủ yếu nhưng không hoàn toàn chỉ ở vùng gắn kết phối tử dẫn đến đột biến chức năng protein; ví dụ về các đột biến axit amin này bao gồm Ser463Pro,

Val543Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn và Asp538Gly, với các đột biến ở axit amin 537 và 538 là các đột biến chủ yếu xuất hiện hiện nay. Trước đó, các đột biến này chưa được phát hiện trong bộ gen từ các mẫu bệnh phẩm ung thư vú nguyên phát được mô tả trong cơ sở dữ liệu bộ gen ung thư Atlas. Trong số 390 mẫu bệnh phẩm ung thư vú nguyên phát biểu hiện ER không có đột biến điểm nào được phát hiện ở ESR1 (*Cancer Genome Atlas Network*, 2012 *Nature* 490: 61-70). Các đột biến vùng gắn kết phối tử này được cho là đã phát triển tính kháng các liệu pháp endocrin bằng chất ức chế aromataza do các đột biến thụ thể này có hoạt tính phiên mã cơ bản trong sự vắng mặt của estradiol. Cấu trúc tinh thể của ER, được đột biến ở axit amin 537 và 538, cho thấy rằng cả hai đột biến này thích hợp cho hình dạng chủ vận của ER bằng cách xáo trộn vị trí của sợi xoắn kép 12 để cho phép hoạt hóa đồng thời và nhờ đó bắt chước chủ vận ER thể đại đã hoạt hóa. Theo các tài liệu “Toy et al, *Nat. Genetics* 2013, 45: 1439-1445; Robinson et al, *Nat. Genetics* 2013, 45: 1446-1451; Li, S. et al. *Cell Rep.* 4, 1116-1130 (2013)” thì các liệu pháp endocrin như tamoxifen và fulvestrant có thể vẫn gắn kết với ER đột biến và ức chế hoạt hóa phiên mã đến một mức độ nào đó và fulvestrant có khả năng phân hủy Tyr537Ser nhưng liều cao hơn có thể cần thiết để ức chế hoàn toàn thụ thể. Do đó, hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó sẽ rất hữu hiệu trong việc điều hòa ức chế biểu hiện và đối kháng đột biến ER mặc dù ở giai đoạn này các đột biến ESR1 có làm thay đổi hiệu quả lâm sàng hay không vẫn chưa được biết đến.

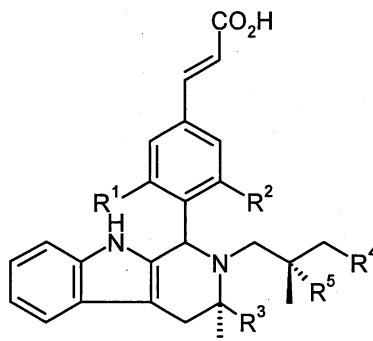
Ngoại trừ các cơ chế kháng hoặc tổ hợp các cơ chế kháng xuất hiện, nhưng nhiều cơ chế vẫn dựa trên hoạt tính phụ thuộc ER và việc loại bỏ thụ thể này thông qua cơ chế SERD là biện pháp tốt nhất để loại bỏ thụ thể ER α ra khỏi tế bào. Hiện nay, fulvestrant là SERD duy nhất được chấp nhận để sử dụng trên lâm sàng, mặc dù đặc tính bào chế, đặc tính dược lý của dược chất này có nhiều hạn chế do liều lượng hàng tháng chỉ giới hạn ở 500mg dẫn đến số lượng thụ thể ở các mẫu bệnh phẩm được ức chế nhỏ hơn 50% so với sự điều hòa ức chế biểu hiện hoàn toàn của thụ thể quan sát được trong các thử nghiệm *in vitro* (Wardell, et al, *Biochem. Pharm.*, 2011, 82:122-130). Do đó, cần có chất hướng đích ER thể hệ mới có đặc tính dược lý và cơ chế SERD thích hợp để tạo ra hiệu quả điều trị bệnh cao ở giai đoạn sớm, di căn và kháng thuốc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất có hoạt tính chống khối u rất mạnh, hữu ích trong ức chế sự tăng sinh tế bào ác tính không kiểm soát. Hợp chất theo sáng chế

có tác dụng chống khối u do làm giảm kích thước khối u đến mức tối thiểu, có hoạt tính như SERD.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó.



(I)

trong đó:

R^1 và R^2 độc lập là H hoặc F;

R^3 là H hoặc methyl; và

hoặc:

a) R^4 là H và R^5 là F; hoặc

b) R^4 là F và R^5 là H.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) nêu trên, được phẩm và chế phẩm kết hợp chứa hợp chất này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể A của hợp chất theo ví dụ 7.

Fig.2 là đồ thị thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1.

Fig.3 là đồ thị thể hiện nhiệt độ đo nhiệt lượng quét vi sai của dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1.

Fig.4 là đồ thị thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể A của hợp chất theo ví dụ 1.

Fig.5 là đồ thị thể hiện nhiệt độ phân tích nhiệt trọng của dạng tinh thể A của hợp chất theo ví dụ 1.

Fig.6 là đồ thị thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể C của hợp chất theo ví dụ 1.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nhiệt độ phân tích nhiệt trọng của dạng tinh thể C của hợp chất theo ví dụ 1.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X của hợp chất theo ví dụ 11.

Fig.9 là đồ thị thể hiện vết đo nhiệt lượng quét vi sai của hợp chất theo ví dụ 11.

Fig.10 là đồ thị thể hiện kết quả nghiên cứu ghép ngoại lai MCF-7 bằng hợp chất theo ví dụ 1 và AZD2014.

Fig.11 và Fig.12 là đồ thị thể hiện kết quả nghiên cứu hiệu quả ghép ngoại lai thiếu hụt estrogen trong thời gian dài HCC1428 bằng hợp chất theo ví dụ 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất có công thức (I) có một, hai hoặc ba tâm bất đối và sáng chế cũng đề cập đến các dạng đồng phân quang học tinh khiết của hợp chất có công thức (I) hoặc hỗn hợp của chúng theo tỷ lệ bất kỳ. Các dạng đồng phân hoạt quang có thể được điều chế bằng phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ bằng cách điều chế từ nguyên liệu hoạt quang ban đầu hoặc phân tách hỗn hợp racemic. Tương tự, hoạt tính chống khối u của các dạng đồng phân này cũng được đánh giá bằng các phương pháp chuẩn.

Chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang cụ thể của hợp chất theo sáng chế có thể có hoạt tính mạnh hơn chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang khác của chính hợp chất này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dưới dạng chất đồng phân đối ảnh duy nhất này có lượng dư chất đồng phân đối ảnh (%ee) ≥ 95 , $\geq 98\%$ hoặc $\geq 99\%$. Tốt hơn nữa, chất đồng phân đối ảnh duy nhất này có lượng dư chất đồng phân đối ảnh (%ee) $\geq 99\%$.

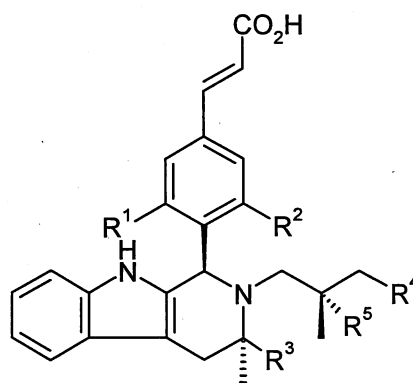
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) dưới dạng chất đồng phân đối ảnh duy nhất này có lượng dư chất đồng phân đối ảnh (%ee) ≥ 95 , $\geq 98\%$ hoặc $\geq 99\%$ hoặc muối được dụng của nó, và chất mang hoặc tá

được pha loãng được dụng. Tốt hơn nữa, chất đồng phân đối ảnh duy nhất này có lượng dư chất đồng phân đối ảnh (%ee) $\geq 99\%$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dưới dạng chất đồng phân không đối quang duy nhất này có lượng dư chất đồng phân không đối quang (%de) ≥ 95 , $\geq 98\%$ hoặc $\geq 99\%$. Tốt hơn nữa, chất đồng phân không đối quang duy nhất này có lượng dư chất đồng phân không đối quang (%de) $\geq 99\%$.

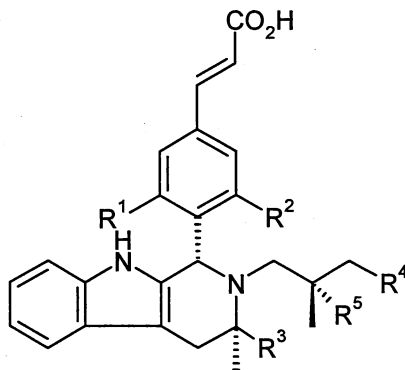
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) dưới dạng chất đồng phân không đối quang duy nhất này có lượng dư chất đồng phân không đối quang (%de) ≥ 95 , $\geq 98\%$ hoặc $\geq 99\%$ hoặc muối được dụng của nó, và chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng. Tốt hơn nữa, chất đồng phân không đối quang duy nhất này có lượng dư chất đồng phân không đối quang (%de) $\geq 99\%$.

Theo một khía cạnh cụ thể, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức (IA):



(IA)

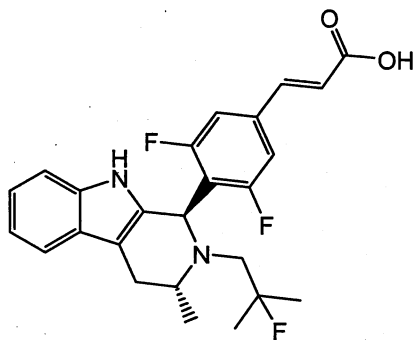
Theo một khía cạnh khác, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức (IB):



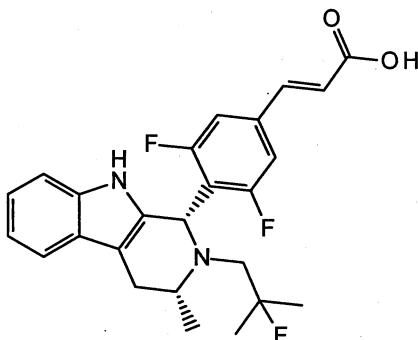
(IB)

Cần hiểu rằng thuật ngữ “hợp chất có công thức (I)” được dùng trong bản mô tả để chỉ hợp chất có công thức (IA) và/hoặc công thức (IB), trừ khi có quy định khác.

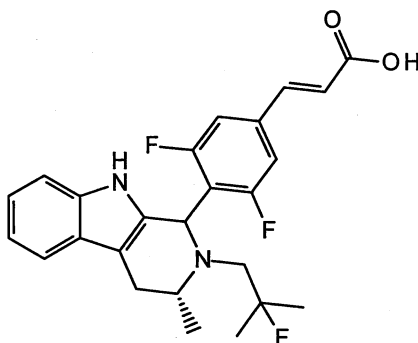
Ví dụ về hợp chất có công thức (IA) là axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic theo ví dụ 1.



Ví dụ về hợp chất có công thức (IB) là chất đồng phân của hợp chất nêu trên, tức là axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1S,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic.



Cả hai chất đồng phân này là ví dụ về axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic, tức là hợp chất có công thức (I).



Một số hợp chất có công thức (I) có khả năng kết tinh và có thể tồn tại dưới nhiều dạng tinh thể. Cần hiểu rằng sáng chế cũng bao gồm dạng tinh thể hoặc dạng vô định hình của hợp chất có công thức (I), hoặc hỗn hợp của chúng, có tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc thụ thể estrogen, Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng biết được phương pháp xác định tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc thụ thể estrogen của dạng tinh thể hoặc dạng vô định hình này bằng các phương pháp chuẩn.

Đã biết rằng hợp chất tinh thể có thể được phân tích bằng các phương pháp thông thường, như phân tích nhiễu xạ bột tia X (X-Ray Powder Diffraction - XRPD), đo nhiệt lượng quét vi sai (Differential Scanning Calorimetry - DSC), phân tích nhiệt trọng (Thermal Gravimetric Analysis - TGA), phân tích phổ hồng ngoại phản xạ khuếch tán biến đổi Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform - DRIFT), phân tích phổ hồng ngoại ở bước sóng ngắn (Near Infrared - NIR), phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân ở trạng thái rắn và/hoặc lỏng. Hàm lượng nước của hợp chất tinh thể có thể được xác định bằng phân tích Karl-Fischer.

Ví dụ về hợp chất có công thức (I) khả năng kết tinh là hợp chất theo ví dụ 7 và một dạng tinh thể của hợp chất này đã được xác định.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit (E)-3-(4-(2-((S)-3-fluoro-2-methylpropyl)-3,3-dimethyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể A (hợp chất theo ví dụ 7).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 4,5^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 10,8^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất hai đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 4,5$ và $10,8^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với các đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 4,5^\circ, 4,8^\circ, 6,1^\circ, 7,9^\circ, 9,9^\circ, 10,8^\circ, 13,4^\circ, 14,0^\circ, 14,3^\circ$ và $18,5^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 4,5^\circ \pm 0,2^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 10,8^\circ \pm 0,2^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất hai đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 4,5^\circ$ và $10,8^\circ \pm 0,2^\circ$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể A theo ví dụ 7 có mẫu nhiễu xạ bột tia X với các đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 4,5^\circ, 4,8^\circ, 6,1^\circ, 7,9^\circ, 9,9^\circ, 10,8^\circ, 13,4^\circ, 14,0^\circ, 14,3^\circ$ và $18,5^\circ \pm 0,2^\circ$.

Ví dụ khác về hợp chất có công thức (I) có khả năng kết tinh là hợp chất theo ví dụ 1.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 8,4^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 10,9^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất hai đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 8,4^\circ$ và $10,9^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với các đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 8,4^\circ, 10,9^\circ, 18,3^\circ, 24,0^\circ$ và $14,0^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với các đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-theta} = 8,4^\circ, 10,9^\circ, 18,3^\circ, 24,0^\circ, 14,0^\circ, 19,0^\circ, 14,4^\circ, 13,0^\circ, 15,3^\circ, 20,6^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.2.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 8,4^\circ \pm 0,2^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất một đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 10,9^\circ \pm 0,2^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất hai đỉnh đặc trưng ở $2\text{-}\theta = 8,4^\circ$ và $10,9^\circ \pm 0,2^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với các đỉnh đặc trưng ở góc $2\text{-}\theta = 8,4, 10,9, 18,3, 24,0$ và $14,0^\circ \pm 0,2^\circ$.

Sáng chế cũng đề xuất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dạng tinh thể B có mẫu nhiễu xạ bột tia X với các đỉnh đặc trưng ở $2\text{-}\theta = 8,4^\circ, 10,9^\circ, 18,3^\circ, 24,0^\circ, 14,0^\circ, 19,0^\circ, 14,4^\circ, 13,0^\circ, 15,3^\circ, 20,6^\circ \pm 0,2^\circ$.

Đối với dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1, tốt hơn nếu độ kết tinh lớn hơn khoảng 60%, tốt hơn nữa nếu lớn hơn khoảng 80%, tốt hơn nếu lớn hơn khoảng 90% và tốt hơn nữa nếu lớn hơn khoảng 95%. Tốt nhất nếu độ kết tinh là lớn hơn khoảng 98%.

Ngoài ra, đối với dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1, tốt hơn nếu hợp chất này hầu như không chứa dạng tinh thể hoặc dạng vô định hình khác. Thuật ngữ “gần như không chứa” có nghĩa là lớn hơn khoảng 60%, tốt hơn nữa nếu lớn hơn khoảng 80%, tốt hơn nếu lớn hơn khoảng 90%, tốt hơn nữa nếu lớn hơn khoảng 95% và tốt nhất nếu lớn hơn khoảng 98% dạng đa hình đơn.

Cần hiểu rằng trị số $2\text{-}\theta$ của mẫu nhiễu xạ bột tia X có thể sai lệch đôi chút giữa các thiết bị đo hoặc giữa các mẫu, do đó trị số này không phải là trị số tuyệt đối.

Đã biết rằng mẫu nhiễu xạ bột tia X thu được có thể có một hoặc nhiều sai số đo phụ thuộc vào điều kiện đo (như thiết bị hoặc máy đo). Cụ thể, cường độ mẫu nhiễu xạ bột tia X có thể phụ thuộc vào điều kiện đo. Do đó, trừ khi có quy định khác cần hiểu rằng dạng tinh thể của hợp chất theo sáng chế không chỉ giới hạn ở tinh thể có mẫu nhiễu xạ bột tia X giống hệt như mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên các hình vẽ liên quan, và tinh thể bất kỳ có mẫu nhiễu xạ bột tia X gần giống với mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên các hình vẽ này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể đánh giá được mức độ giống nhau của các mẫu nhiễu xạ bột tia X.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng cường độ tương đối của các đỉnh có thể bị ảnh hưởng bởi kích cỡ hạt chất cần đo, ví dụ các hạt có kích cỡ trên 30 μ m và tỷ lệ hình dạng hạt không đồng nhất có thể ảnh hưởng đến kết quả phân tích mẫu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng vị trí phản xạ có thể bị ảnh hưởng bởi chiều cao chính xác của mẫu nằm trong nhiễu xạ kế và kết quả hiệu chỉnh về 0 của nhiễu xạ kế. Độ phẳng của bề mặt mẫu có thể cũng ảnh hưởng ít đến vị trí phản xạ. Do đó, dữ liệu mẫu nhiễu xạ không phải là trị số tuyệt đối (xem tài liệu “Jenkins, R & Snyder, R.L. *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*, John Wiley & Sons 1996; Bunn, C.W. (1948), *Chemical Crystallography*, Clarendon Press, London; Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), *X-Ray Diffraction Procedures*”).

Nhìn chung, sai số đo của góc nhiễu xạ trên mẫu nhiễu xạ bột tia X bằng khoảng $\pm 0,2^\circ$ 2-theta, và sai số này cũng cần được tính đến khi phân tích dữ liệu mẫu nhiễu xạ bột tia X. Ngoài ra, cần hiểu rằng cường độ nhiễu xạ có thể thay đổi phụ thuộc vào điều kiện đo và quá trình chuẩn bị mẫu (tốt hơn nếu cường độ nhiễu xạ thay đổi phụ thuộc vào hướng nhiễu xạ).

Hợp chất cụ thể theo sáng chế là hợp chất được điều chế theo mỗi ví dụ của sáng chế, và mỗi hợp chất này là một khía cạnh phụ thuộc của sáng chế. Ngoài ra, hợp chất cụ thể theo sáng chế là muối được dụng được điều chế theo mỗi ví dụ của sáng chế, và mỗi hợp chất này là một khía cạnh phụ thuộc của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), được điều chế theo ví dụ bất kỳ của sáng chế.

Dấu hiệu khác là khía cạnh bất kỳ nằm trong phạm vi của sáng chế với điều kiện là các ví dụ cụ thể, như ví dụ 1, 2, 3 v.v. không được yêu cầu bảo hộ độc lập.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng một số hợp chất có công thức (I) chứa nguyên tử cacbon bất đối được thể, do đó có thể tồn tại, và được phân lập ở dạng đồng phân hoạt quang và hỗn hợp raxemic. Một số hợp chất có công thức (I) có thể có dạng đa hình. Cần hiểu rằng sáng chế cũng bao gồm dạng raxemic, hoạt quang, dạng đa hình hoặc chất đồng phân không đối quang của hợp chất có công thức (I), hoặc hỗn hợp của chúng có tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc thụ thể estrogen, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng biết được cách thức điều chế dạng đồng phân hoạt quang (ví dụ, bằng cách phân giải dạng raxemic bằng các kỹ thuật tái kết tinh, bằng cách điều chế từ nguyên liệu hoạt quang ban đầu, bằng phương pháp tổng hợp chất đồng phân quang học, bằng phương pháp phân giải enzym, bằng phương pháp biến đổi sinh học, hoặc bằng phương pháp phân tách sắc ký sử dụng pha tĩnh là chất đồng phân quang học) và phương pháp xác định tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc thụ thể estrogen của các dạng đồng phân này bằng các phương pháp chuẩn.

Cần hiểu rằng một số hợp chất có công thức (I) có thể có chất đồng phân hổ biến. Cần hiểu rằng hợp chất theo sáng chế cũng bao gồm dạng đồng phân hổ biến, hoặc hỗn hợp của chúng, có tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc thụ thể estrogen và không chỉ giới hạn ở dạng đồng phân hổ biến bất kỳ xuất hiện trong các công thức cấu tạo hoặc định tên trong các ví dụ. Nhìn chung, chỉ một trong số các dạng đồng phân hổ biến bất kỳ này được định tên trong các ví dụ dưới đây hoặc được thể hiện trong công thức cấu tạo liên quan bất kỳ dưới đây

Hợp chất theo sáng chế cũng chứa toàn bộ các đồng vị của các nguyên tử xuất hiện trong hợp chất này. Các đồng vị bao gồm các nguyên tử có cùng số proton nhưng khác nhau về số khối, ví dụ các đồng vị của hydro bao gồm triti và đơteri. Các đồng vị của carbon bao gồm ^{13}C và ^{14}C . Dạng đồng vị đơteri của hợp chất theo ví dụ 1 được mô tả trong ví dụ 10.

Ví dụ về muối được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) là muối kim loại kiềm hoặc muối kim loại kiềm thổ, như muối natri, canxi hoặc magie, hoặc muối amoni, hoặc muối được điều chế bằng bazơ hữu cơ như metylamin, dimetylamin, trimetylamin, piperidin, morpholin hoặc tris-(2-hydroxyetyl)amin. Muối được dụng thích hợp khác của

hợp chất có công thức (I) bao gồm muối kim loại khác, như kali, kẽm, hoặc các cation kim loại khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một khía cạnh, muối được dụng của hợp chất có công thức (I) là muối với cation kim loại, muối amoni hoặc muối được điều chế bằng bazơ hữu cơ.

Ví dụ về muối được dụng thích hợp khác của hợp chất có công thức (I) là muối được tạo ra trong cơ thể người hoặc động vật sau khi sử dụng hợp chất có công thức (I).

Ví dụ về muối được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) là muối cộng hợp axit, ví dụ muối cộng hợp với axit hữu cơ hoặc axit vô cơ mạnh, như axit hydrocloric, axit hydrobromic, axit sulphuric hoặc axit trifloaxetic. Muối được dụng thích hợp khác của hợp chất có công thức (I) được mô tả trong ví dụ 1. Theo một khía cạnh khác, muối được dụng của hợp chất có công thức (I) là muối cộng hợp axit.

Các thử nghiệm điều chế muối của hợp chất có công thức (I) đã đánh giá hoạt tính của hợp chất theo ví dụ 1 (axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic) để tạo ra muối tinh thể. Các dạng axit và bazơ sau được thử nghiệm: axit axetic, axit adipic, axit benzen sulfonic, axit benzoic, axit xinamic, axit xitric, axit D,L-lactic, axit etan disulfonic, axit etan sulfonic, axit fumaric, axit hydrocloric, axit L-tartaric, axit maleic, axit malic, axit malonic, axit metan sulfonic, axit napadisyllic, axit phosphoric, sacarin, axit succinic, axit sulphuric, axit toluen sulfonic, canxi axetat, dietylamín, etanolamin, etylendiámin, hydroxyetylpyrrolidin, magie axetat, meglumin, piperazin, kali hydroxit, natri hydroxit, t-butylamin, trietanolin, tris(hydroxymetyl)aminometan (Tris) và N,N-dietyletanolamin.

Trong số các axit và bazơ nêu trên, không phải lúc nào cũng thu được muối rắn có thể phân lập hoặc thu được ở dạng tinh thể trong các điều kiện thử nghiệm được sử dụng. Tốt hơn nếu muối của hợp chất theo ví dụ 1 bao gồm muối có thể được phân lập ở dạng tinh thể, ví dụ muối của axit benzen sulfonic (muối besylat), muối của axit succinic (muối succinat) và muối của axit maleic (muối maleat).

Theo một khía cạnh, muối thích hợp của hợp chất theo ví dụ 1 bao gồm besylat, succinat và maleat. Theo một khía cạnh khác, muối thích hợp của hợp chất theo ví dụ 1 là muối maleat được mô tả trong ví dụ 11.

Cần hiểu rằng đồng tinh thể được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) cũng là một khía cạnh của sáng chế. Để tránh nghi ngờ, thuật ngữ đồng tinh thể (hoặc

đồng kết tinh) là hệ nhiều thành phần chứa hoạt chất chính (dược chất) và hợp chất liên hợp (hoặc hợp chất đồng liên kết). Trong đồng tinh thể, cả dược chất và hợp chất liên hợp (hoặc hợp chất đồng liên kết) tồn tại riêng dưới dạng chất rắn ở nhiệt độ phòng khi ở trạng thái tinh khiết (để phân biệt đồng tinh thể với solvat hoặc hydrat). Thuật ngữ này không bao gồm các muối, trong đó hầu hết hoặc toàn bộ trao đổi proton xuất hiện giữa dược chất và hợp chất liên hợp. Trong đồng tinh thể, dược chất và hợp chất đồng liên kết tương tác bởi liên kết hydro hoặc liên kết không đồng hóa trị khác, ví dụ về hợp chất đồng liên kết được dụng bao gồm hợp chất trung tính như nicotinamit, resorcinol và xylolol, cũng như hợp chất có thể ion hóa như axit oxalic, axit 3,5-đihydroxybenzoic và isoquinolin (xác định mức độ trao đổi proton để xem muối hoặc đồng tinh thể được tạo ra). Lưu ý rằng đồng tinh thể có thể tự tạo ra dạng solvat, bao gồm hydrat.

Cần hiểu rằng solvat được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) cũng là một khía cạnh của sáng chế, ví dụ về solvat được dụng thích hợp là hydrat như hemi-hydrat, mono-hydrat, di-hydrat hoặc tri-hydrat hoặc dạng hydrat khác của nó.

Cần hiểu rằng tiền dược chất được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) cũng là một khía cạnh của sáng chế. Theo đó, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng tiền dược chất, tức là hợp chất bị chuyển hóa trong cơ thể người hoặc động vật để giải phóng hợp chất theo sáng chế. Tiền dược chất có thể được sử dụng để biến đổi đặc tính sinh lý học và/hoặc đặc tính dược động học của hợp chất theo sáng chế. Tiền dược chất có thể được tạo ra khi hợp chất theo sáng chế chứa nhóm thế hoặc phần tử thế thích hợp để gắn nhóm biến đổi đặc tính vào, ví dụ về tiền dược chất bao gồm este có thể phân cắt *in vivo* có thể được tạo ra ở nhóm carboxy trong hợp chất có công thức (I).

Theo đó, sáng chế bao gồm hợp chất có công thức (I) khi được tạo ra bằng cách điều chế hữu cơ và khi được tạo ra trong cơ thể người hoặc động vật bằng cách phân cắt tiền dược chất của nó. Theo đó, sáng chế bao gồm hợp chất có công thức (I) được tạo ra bằng cách điều chế hữu cơ và cũng bao gồm hợp chất có công thức (I) được tạo ra trong cơ thể người hoặc động vật bằng cách chuyển hóa tiền dược chất, tức là hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất được điều chế hoặc hợp chất được tạo ra bởi chuyển hóa.

Tiền dược chất được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) được điều chế dựa trên phác đồ điều trị thích hợp để sử dụng cho cơ thể người hoặc động vật mà không có hoạt tính dược học không mong muốn và không gây độc tính quá mức.

Ví dụ về các dạng tiền dược chất được mô tả trong các tài liệu sau:

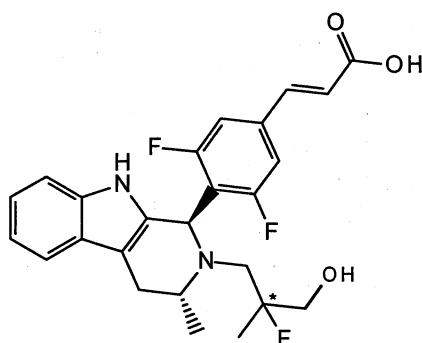
- a) *Methods in Enzymology*, Vol. 42, p. 309-396, edited by K. Widder, *et al.* (Academic Press, 1985);
- b) *Design of Pro-drugs*, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);
- c) *A Textbook of Drug Design and Development*, edited by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 “*Design and Application of Pro-drugs*”, by H. Bundgaard p. 113-191 (1991);
- d) H. Bundgaard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8, 1-38 (1992);
- e) H. Bundgaard, *et al*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, 285 (1988);
- f) N. Kakeya, *et al*, *Chem. Pharm. Bull*, 32, 692 (1984);
- g) T. Higuchi and V. Stella, “*Pro-drugs as Novel Delivery Systems*”, A.C.S. Symposium Series, Volume 14; và
- h) E. Roche (editor), “*Bioreversible Carriers in Drug Design*”, Pergamon Press, 1987.

Ví dụ về tiền dược chất được dùng thích hợp của hợp chất có công thức I chứa nhóm carboxy là este có thể phân cắt *in vivo* của nó, ví dụ về este có thể phân cắt *in vivo* của hợp chất có công thức I chứa nhóm carboxy là este được dùng được phân cắt trong cơ thể người hoặc động vật để tạo ra axit gốc, ví dụ về este được dùng chứa nhóm carboxy thích hợp bao gồm (C₁₋₆)alkyl este như metyl, etyl và *tert*-butyl, (C₁₋₆)alkoxymetyl este như metoxymetyl este, (C₁₋₆)alkanoyloxymetyl este như pivaloyloxymetyl este, 3-phtalidyl este, (C₃₋₈)xycloalkylcarbonyloxy-(C₁₋₆)alkyl este như xyclopentylcarbonyloxymetyl và 1-xyclohexylcarbonyloxyetyl este, 2-oxo-1,3-dioxolenylmetyl este như 5-metyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-ylmetyl este và (C₁₋₆)alkoxycarbonyloxy-(C₁₋₆)alkyl este như metoxycarbonyloxymetyl và 1-metoxycarbonyloxyetyl este.

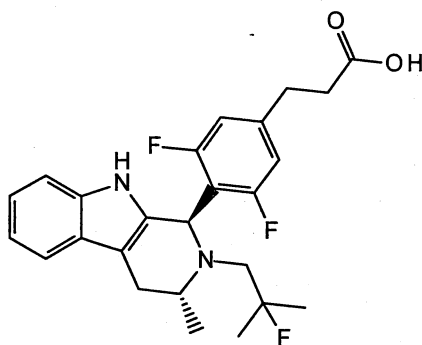
Ví dụ về tiền dược chất được dùng thích hợp của hợp chất có công thức I chứa nhóm carboxy là amit có thể phân cắt *in vivo*, như N-C₁₋₆alkyl và N,N-đi-(C₁₋₆alkyl)amit như N-metyl, N-etyl, N-propyl, N,N-dimetyl, N-etyl-N-metyl hoặc N,N-dietylmit.

Tác dụng *in vivo* của hợp chất có công thức (I) có thể được tạo ra một phần bởi một hoặc nhiều chất chuyển hóa được tạo ra trong cơ thể người hoặc động vật sau khi sử dụng hợp chất có công thức (I). Như nêu trên, tác dụng *in vivo* của hợp chất có công thức (I) cũng có thể được tạo ra bằng cách chuyển hóa tiền dược chất.

Hai chất đồng phân chuyển hóa có hoạt tính của hợp chất theo ví dụ 1 đã được xác định từ hệ *in vitro* của người như được thể hiện dưới đây (trong đó các chất đồng phân này là chất đồng phân không đối quang do tồn tại cả hai cấu hình ở vị trí carbon được đánh dấu *), và hai chất đồng phân này được điều chế theo ví dụ 14 A và ví dụ 14B:



Ngoài ra, hợp chất sau là chất chuyển hóa có hoạt tính của hợp chất theo ví dụ ở một số loài, như ở chuột:



Các chất chuyển hóa có hoạt tính này tạo ra các khía cạnh phụ thuộc khác của sáng chế.

Cần hiểu rằng trong bản mô tả này khi nhóm bị giới hạn bởi thuật ngữ “được định nghĩa nêu trên” hoặc “được định nghĩa ở trên” nhóm này bao gồm định nghĩa xuất hiện lần đầu hoặc rộng nhất cũng như một hoặc toàn bộ định nghĩa cụ thể cho nhóm này.

Ví dụ về hợp chất cụ thể theo sáng chế bao gồm hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó, trong đó trừ khi có quy định khác, mỗi R^1 và R^2 được định nghĩa ở trên hoặc theo các mệnh đề sau:

Theo một khía cạnh, R^1 là hydro. Theo một khía cạnh khác, R^1 là flo.

Theo một khía cạnh, R^2 là hydro. Theo một khía cạnh khác, R^2 là flo.

Theo một khía cạnh, cả R^1 và R^2 là hydro. Theo một khía cạnh khác, cả R^1 và R^2 là flo. Theo một khía cạnh khác, R^1 là hydro và R^2 là flo.

Theo một khía cạnh, R^3 là hydro. Theo một khía cạnh khác, R^3 là metyl.

Theo một khía cạnh, R^4 là hydro và R^5 là flo. Theo một khía cạnh khác, R^5 là hydro và R^4 là flo.

Ví dụ cụ thể về hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức (I) được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Ví dụ cụ thể về hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm:

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

hoặc muối được dụng của nó.

Hợp chất cụ thể khác theo sáng chế là hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm:

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4(1R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4(1R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4(1R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4(1R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3-flo-4(1R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic; và

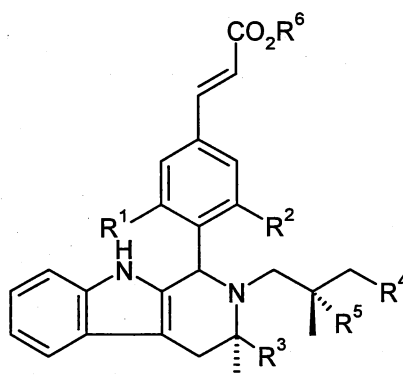
axit (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoic;

hoặc muối được dụng của nó.

Muối được dụng cụ thể theo sáng chế là (1R,3R)-1-{4-[(E)-2-carboxyetenyl]-2,6-điflophenyl}-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-beta-carbolin-2-ium maleat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó. Quy trình điều chế hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó được mô tả bằng các quy trình biến thể thích hợp dưới đây trong đó, trừ khi có quy định khác, R^1 đến R^5 được định nghĩa ở trên. Nguyên liệu ban đầu có thể được điều chế bằng các quy trình chuẩn. Quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu được mô tả kết hợp với các quy trình biến thể thích hợp dưới đây và trong các ví dụ kèm theo. Theo cách khác, nguyên liệu ban đầu được điều chế bằng các quy trình tương tự đã biết trong lĩnh vực này.

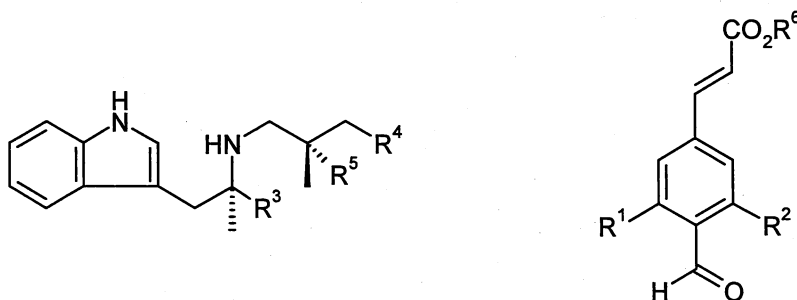
Hợp chất có công thức (I) được điều chế bằng cách thủy phân este có công thức (II), trong đó R^6 là C_{1-6} alkyl, như metyl. Phản ứng thủy phân này được thực hiện trong sự có mặt của bazơ, như natri hydroxit trong dung môi thích hợp (như dung dịch nước THF và MeOH (hoặc rượu tương tự khác), hoặc trong dung dịch nước rượu, ví dụ dung dịch nước isopropanol) và ở nhiệt độ thích hợp, thường là nhiệt độ phòng.



(II)

Hợp chất có công thức (II) có thể được điều chế bằng cách:

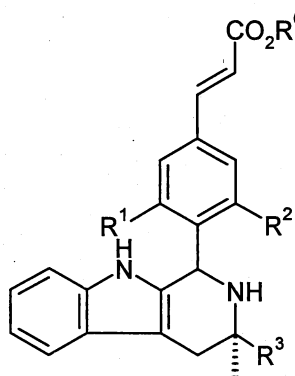
a) cho hợp chất có công thức (III) phản ứng với hợp chất có công thức (IV) trong điều kiện phản ứng Pictet-Spengler thích hợp (như trong sự có mặt của axit (như axit axetic) và trong dung môi thích hợp (ví dụ toluen) và ở nhiệt độ thích hợp (như 80°C)); hoặc



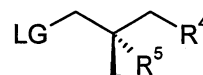
(III)

(IV)

b) cho hợp chất có công thức (V) phản ứng với hợp chất có công thức (VI), trong đó LG là nhóm rời chuyển đã biết trong lĩnh vực này, như halogenua hoặc triflometansulfonat (triflat), triflat thích hợp, trong sự có mặt của bazơ (ví dụ bazơ amin, như N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin) và dung môi phân cực thích hợp (như đioxan) ở nhiệt độ thích hợp (như nằm trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 90°C).

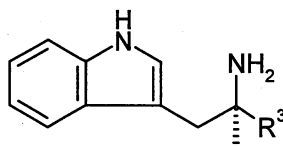


(V)



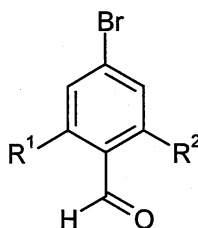
(VI)

Hợp chất có công thức (III) có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất có công thức (VII) phản ứng với hợp chất có công thức (VI) trong điều kiện như trong phản ứng của hợp chất có công thức (V) với hợp chất có công thức (VI).



(VII)

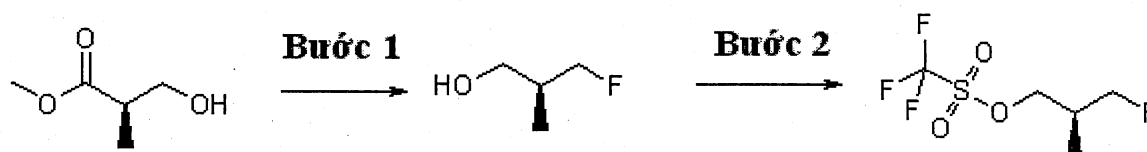
Hợp chất có công thức (IV) có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất có công thức (VIII) phản ứng với este alkyl acrylat (như methyl acrylat khi R⁶ là methyl) trong điều kiện phản ứng Heck thích hợp; tức là trong sự có mặt của aryl phosphin (ví dụ tri-*o*-tolylphosphin), chất xúc tác paladi (như paladi (II) axetat và bazơ (như triethylamin) trong dung môi thích hợp (như DMA) và ở nhiệt độ thích hợp (ví dụ 80°C).



Hợp chất có công thức (V) có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất có công thức (VII) phản ứng với hợp chất có công thức (IV) trong điều kiện như mô tả trong phản ứng của hợp chất có công thức (III) với hợp chất có công thức (IV).

Hợp chất có công thức (VI), trong đó LG là triflat có thể được điều chế theo Sơ đồ 1 và Sơ đồ 2. Hợp chất có công thức (VI), trong đó LG không phải là triflat có thể được điều chế bằng cùng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

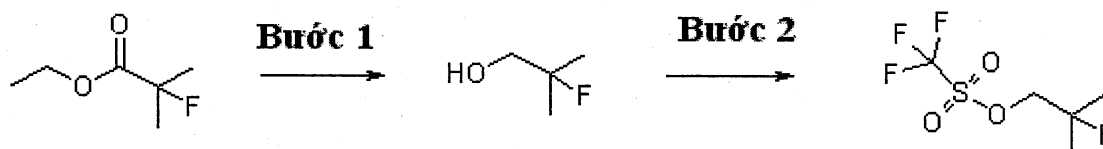
Sơ đồ 1



Bước 1: Chất flo hóa, ví dụ N,N-dietyl-1,1,2,3,3,3-hexafloropropan-1-amin/DCM/RT, tiếp theo chất khử, ví dụ lithi nhôm hydrit/THF/nhiệt độ phòng.

Bước 2: Triflometansulfonic anhydrit/bazơ, ví dụ 2,6-lutidin/DCM/0°C

Sơ đồ 2



Bước 1: Chất khử, ví dụ lithi nhôm hydrit/ete/0°C

Bước 2: Triflometansulfonic anhydrit/bazơ, ví dụ 2,6-lutidin/DCM/-10°C

Hợp chất có công thức (I) là hợp chất bất đối. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng các phản ứng chọn lọc đồng phân lập thể có thể được sử dụng để thu được chất đồng phân mong muốn. Theo cách khác, hóa lập thể có thể được điều chỉnh bằng phương pháp thích hợp, như bằng cách epime hóa từ chất đồng phân *cis* thành chất đồng phân *trans* nhờ axit hóa hợp chất trung gian chứa nhóm amin đã được bảo vệ như được mô tả trong ví dụ 4 (và ví dụ được mô tả trong J. Org. Chem. 2009, 74, 2771-2779).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức (I), bao gồm bước thủy phân hợp chất có công thức (II), trong sự có mặt của bazơ thích hợp.

Cần hiểu rằng thứ tự của các bước trong các quy trình nêu trên có thể được thay đổi theo các cách khác.

Cần hiểu rằng hợp chất bất kỳ có công thức (I) được điều chế bằng quy trình bất kỳ nêu trên có thể được biến đổi thành hợp chất có công thức (I) khác khi cần.

Khi cần, muối được dụng của hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất này phản ứng với bazơ thích hợp.

Khi cần, tiền dược chất được dụng của hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế bằng quy trình thông thường, ví dụ este có thể phân cắt *in vivo* của hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất có công thức (I) chứa nhóm carboxyl phản ứng với rượu được dụng. Thông tin chi tiết hơn về tiền dược chất đã được mô tả ở trên.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng hiểu rằng trong một số phản ứng theo sáng chế, các nhóm bất kỳ nhạy với điều kiện phản ứng trong hợp chất cần được bảo vệ. Các phương pháp thích hợp để bảo vệ các nhóm này là đã biết trong lĩnh vực này. Nhóm bảo vệ thông thường có thể được sử dụng theo quy định chuẩn (xem T.W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1991). Do đó, khi chất phản ứng chứa các nhóm như amino, carboxy hoặc hydroxy, thì các nhóm này cần được bảo vệ trong một số phản ứng theo sáng chế.

Ví dụ về nhóm bảo vệ thích hợp cho nhóm amino hoặc alkylamino là nhóm axyl, ví dụ nhóm alkanoyl như axetyl, nhóm alkoxycarbonyl, ví dụ nhóm metoxycarbonyl, etoxycarbonyl hoặc *t*-butoxycarbonyl, nhóm arylmetoxycarbonyl, ví dụ benzyloxycarbonyl, hoặc nhóm aroyl, ví dụ benzoyl. Các điều kiện khử bảo vệ đối với các nhóm bảo vệ nêu trên cần thay đổi theo nhóm bảo vệ được chọn. Do đó, ví dụ nhóm axyl như alkanoyl hoặc alkoxycarbonyl hoặc aroyl có thể được loại bỏ bằng cách thủy phân với bazơ thích hợp như hydroxit kim loại kiềm, ví dụ lithi hydroxit hoặc natri hydroxit. Theo cách khác nhóm axyl như *t*-butoxycarbonyl có thể được loại bỏ bằng cách xử lý với axit thích hợp như axit hydrocloric, axit sulphuric hoặc axit phosphoric hoặc axit trifloaxetic và nhóm arylmetoxycarbonyl như benzyloxycarbonyl có thể được loại bỏ

bằng cách hydro hóa bằng chất xúc tác như paladi cacbon, hoặc bằng cách xử lý với axit Lewis, ví dụ bo tris(trifloaxetat), ví dụ về nhóm bảo vệ thích hợp khác cho nhóm amino bậc một là nhóm phtaloyl mà có thể được loại bỏ bằng cách xử lý với alkylamin, ví dụ đimetylaminopropylamin, hoặc hydrazin.

Ví dụ về nhóm bảo vệ thích hợp cho nhóm hydroxy là nhóm axyl, ví dụ nhóm alkanoyl như axetyl, nhóm aroyl, ví dụ benzoyl, hoặc nhóm arylmetyl, ví dụ benzyl. Các điều kiện khử bảo vệ đối với các nhóm bảo vệ nêu trên cần thay đổi theo nhóm bảo vệ được chọn. Do đó, ví dụ nhóm axyl như alkanoyl hoặc aroyl có thể được loại bỏ bằng cách thủy phân với bazơ thích hợp như hydroxit kim loại kiềm, ví dụ lithi hydroxit hoặc natri hydroxit. Theo cách khác, nhóm arylmetyl như benzyl có thể được loại bỏ bằng cách hydro hóa bằng chất xúc tác như paladi cacbon.

Ví dụ về nhóm bảo vệ thích hợp cho nhóm carboxy là nhóm tạo chức este, ví dụ nhóm metyl hoặc etyl mà có thể được loại bỏ bằng cách thủy phân với bazơ như natri hydroxit, hoặc nhóm *t*-butyl mà có thể được loại bỏ bằng cách xử lý với axit, ví dụ axit hữu cơ như axit trifloaxetic, hoặc nhóm benzyl mà có thể được loại bỏ bằng cách hydro hóa bằng chất xúc tác như paladi cacbon.

Các nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ ở công đoạn thích hợp bất kỳ trong quy trình điều chế bằng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Một số hợp chất trung gian (ví dụ, hợp chất có công thức II, III, IV, V, VI, VII và VIII, đặc biệt là hợp chất có công thức II, III và/hoặc V) theo sáng chế là các hợp chất mới và các hợp chất này là các khía cạnh khác của sáng chế.

Thử nghiệm sinh học

Hoạt tính của hợp chất theo sáng chế được đo bằng các thử nghiệm sau.

Thử nghiệm gắn kết ER α

Khả năng gắn kết của hợp chất theo sáng chế với vùng gắn kết phối tử thụ thể estrogen alpha (ER alpha - LBD (GST)) được đánh giá bằng các thử nghiệm cạnh tranh bằng phương pháp chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang rửa giải theo thời gian phát hiện điểm cuối Lanthascreen™ (TR-PRET). Để thực hiện phương pháp Lanthascreen TR-FRET, flophore thích hợp (Fluormone ES2, mã sản phẩm P2645) và vùng gắn kết phối tử thụ thể estrogen alpha tái tổ hợp của người (mã sản phẩm PV4543)

do Invitrogen cung cấp được sử dụng để đánh giá khả năng gắn kết của hợp chất. Nguyên lý của thử nghiệm này là ER alpha-LBD (GST) được bổ sung vào phối tử huỳnh quang để tạo ra phức hợp thụ thể/flophore. Kháng thể kháng GST được đánh dấu tecbi (mã sản phẩm PV3551) được sử dụng để đánh dấu gián tiếp thụ thể bằng cách gắn kết với trình tự đánh dấu GST của nó, và ái lực gắn kết cạnh tranh được đánh giá bằng khả năng dịch chuyển phối tử huỳnh quang của hợp chất thử nghiệm để làm mất tín hiệu TR-FRET giữa kháng thể kháng GST được đánh dấu tecbi và hợp chất đánh dấu. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách bổ sung toàn bộ các chất phản ứng bằng máy trạm vi lỏng Beckman Coulter BioRAPTR FRD:

1. Phân tán bằng sóng âm 120nL hợp chất thử nghiệm vào đĩa thử nghiệm màu đen 384 giếng dung tích nhỏ.
2. Điều chế kháng thể kháng GST được đánh dấu tecbi/ER alpha-LBD 1x trong dung dịch sàng lọc ES2 và ủ trong 20 phút.
3. Bổ sung flophore 1x vào dung dịch kháng thể kháng GST được đánh dấu tecbi/ER alpha-LBD trước khi sử dụng.
4. Phân tán 12µL hỗn hợp chứa kháng thể kháng GST được đánh dấu tecbi/ER alpha-LBD 1x/flophore vào mỗi giếng của đĩa thử nghiệm.
5. Đậy đĩa thử nghiệm để bảo vệ các chất phản ứng khỏi bay hơi và tránh ánh sáng, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.
6. Kích thích ở bước sóng 337nm và đo tín hiệu phát huỳnh quang của mỗi giếng ở bước sóng 490nm và 520nm bằng BMG PheraSTAR.

Hợp chất được bổ sung trực tiếp từ nguồn hợp chất trên vi đĩa chứa hợp chất được pha loãng liên tiếp (4 giếng chứa lần lượt 10mM, 0,1mM, 1µM và 10nM hợp chất cuối cùng) vào vi đĩa thử nghiệm bằng Labcyte Echo 550. Echo 550 is a liquid handler sử dụng công nghệ sóng âm để chuyển trực tiếp dung dịch hợp chất DMSO từ vi đĩa điều chế sang vi đĩa thử nghiệm và hệ thống này được lập trình để chuyển nhiều thể tích nL hợp chất từ các giếng có nguồn gốc từ các đĩa khác nhau để thu được dung dịch pha loãng liên tiếp chứa hợp chất mong muốn trong thử nghiệm, sau đó nạp ngược trở lại vào để chuẩn hóa nồng độ DMSO trong khoảng nồng độ pha loãng. Tổng cộng 120nL hợp chất cộng với DMSO được bổ sung vào mỗi giếng và hợp chất được thử nghiệm ở 12

điểm nồng độ so với nồng độ hợp chất cuối cùng lần lượt bằng 100 μ M, 29,17 μ M, 10,42 μ M, 2,083 μ M, 1 μ M, 0,292 μ M, 0,104 μ M, 0,02083 μ M, 0,01 μ M, 0,002917 μ M, 0,001042 μ M, 0,0001 μ M. Dữ liệu đáp ứng liều TR-PRET của mỗi hợp chất được phân tích bằng gói phần mềm thích hợp (như Origin hoặc Genedata) để thực hiện phân tích đường chuẩn thích hợp. Ái lực gắn kết cạnh tranh với ER alpha được xác định bằng trị số IC₅₀. Trị số này được xác định bằng cách tính toán nồng độ hợp chất cần có để làm giảm 50% hợp chất đánh dấu gắn kết với ER alpha-LBD.

Thử nghiệm điều hòa ức chế biểu hiện thụ thể estrogen ở tế bào MCF-7

Khả năng của hợp chất để điều hòa ức chế biểu hiện một số thụ thể estrogen được đánh giá trong thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch tế bào bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư biểu mô vú ống dẫn sữa MCF-7 của người. Tế bào MCF-7 được hoạt hóa lại trực tiếp từ mẫu bảo quản lạnh (khoảng 5×10^6 tế bào) trong môi trường thử nghiệm (môi trường Dulbecco Eagle cải tiến không chứa phenol đỏ (DMEM) (Sigma D5921) chứa 2mM L-Glutamin và 5% (thể tích/thể tích) huyết thanh bào thai bê đã xử lý than hoạt/dextran. Tế bào được tiêm vào một lần bằng kim tiêm 18G x 1,2mm x 40mm vô trùng và mật độ tế bào được đo bằng thiết bị đếm (Beckman). Tế bào được tiếp tục pha loãng trong môi trường thử nghiệm đến mật độ bằng $3,75 \times 10^4$ tế bào/mL và 40 μ L/giếng được bổ sung vào đĩa nuôi cấy mô màu đen đáy trong suốt 384 giếng (Costar, No. 3712) bằng thiết bị Thermo Scientific Matrix WellMate hoặc Thermo Multidrop. Sau khi cấy tế bào, đĩa được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ (Thiết bị ủ Liconic carousel). Dữ liệu thử nghiệm được tạo ra bằng thiết bị định dạng lại hợp chất Labcyte Echo® kiểu 555 là một bộ phận của hệ thống nuôi cấy tế bào tự động (Integrated Echo 2). Dung dịch gốc chứa 10mM hợp chất thử nghiệm được sử dụng để tạo ra đĩa phân liều hợp chất 384 giếng (Labcyte P-05525-CV1). 40 μ L mỗi dung dịch gốc chứa 10nM hợp chất thử nghiệm được phân tán vào giếng ở góc phần tư thứ nhất, sau đó các dung dịch pha loãng liên tiếp theo tỷ lệ 1:100 trong DMSO được điều chế bằng dụng cụ pha chế Hydra II (MATRIX UK) để lần lượt thu được 40 μ L hợp chất thử nghiệm pha loãng vào các giếng ở góc phần tư thứ hai (0,1mM), 3 (1 μ M) và 4 (0,01 μ M). DMSO (40 μ L) được bổ sung vào giếng ở hàng P trên đĩa nguồn để chuẩn hóa nồng độ DMSO trong khoảng nồng độ này. DMSO (40 μ L) được bổ sung vào hàng O1 và DMSO chứa 100 μ M Faslodex® (40 μ L) được bổ sung vào hàng O3 trên đĩa nguồn hợp chất để thu được các giếng đối chứng. Hệ thống Echo sử dụng công nghệ sóng âm để chuyển trực tiếp dung dịch hợp chất DMSO từ vi

đĩa điều chế sang vi đĩa thử nghiệm. Hệ thống này được lập trình để chuyển các thể tích tăng khoảng 2,5nL giữa các vi đĩa và tạo ra dung dịch pha loãng liên tiếp chứa trong đĩa thử nghiệm, sau đó nạp ngược trở lại vào để chuẩn hóa nồng độ DMSO trong khoảng nồng độ pha loãng. Hợp chất được phân tán vào các đĩa tế bào với đĩa nguồn hợp chất được tạo ra như nêu trên tạo ra 12 phần lặp lại của khoảng nồng độ nằm trong khoảng từ 3 μ M đến 3pM với độ pha loãng 3 lần và một độ pha loãng 10 lần cuối cùng bằng hệ thống Integrated Echo 2. Các giếng đối chứng tín hiệu tối đa được bổ sung với DMSO để thu được nồng độ cuối cùng bằng 0,3% và các giếng đối chứng tín hiệu tối đa được bổ sung với Faslodex® để thu được nồng độ cuối cùng bằng 100nM. Các đĩa được tiếp tục ủ trong 18-22 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, sau đó cố định bằng 20 μ L dung dịch formaldehyt 11,1% (thể tích/thể tích) (trong dung dịch đệm muối phosphat (PBS)) để thu được nồng độ formaldehyt cuối cùng bằng 3,7% (thể tích/thể tích). Các tế bào được cố định ở nhiệt độ phòng trong 20 phút trước khi rửa hai lần bằng 250 μ L PBS/Proclin (PBS chứa chất diệt khuẩn sinh học) bằng máy rửa đĩa BioTek, sau đó 40mL PBS/Proclin được bổ sung vào toàn bộ các giếng và các đĩa được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Phương pháp cố định nêu trên được thực hiện trên hệ thống Integrated Echo 2. Phản ứng thấm miễn dịch được thực hiện bằng hệ thống phân tích tế bào tự động AutoElisa. PBS/Proclin được hút ra khỏi toàn bộ các giếng và các tế bào được thấm với 40 μ L PBS chứa 0,5% Tween™ 20 (thể tích/thể tích) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các đĩa được rửa ba lần trong 250 μ L PBS/0,05% (thể tích/thể tích) Tween 20 chứa Proclin (PBST chứa chất diệt khuẩn sinh học), sau đó 20 μ L ER α (SP1) Kháng thể đơn dòng của thỏ (Thermofisher) 1:1000 trong PBS/Tween™/3% (khối lượng/thể tích) Albumin huyết thanh bò được bổ sung vào. Các đĩa được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C (Thiết bị ủ Liconic carousel), sau đó rửa ba lần trong 250 μ L PBS/0,05% (thể tích/thể tích) Tween™ 20 chứa Proclin (PBST). Sau đó, các đĩa được ủ với 20 μ L/giếng kháng thể AlexaFluor 594 của dê kháng IgG của thỏ hoặc kháng thể AlexaFluor 488 của dê kháng IgG của thỏ (Molecular Probes) với Hoechst theo tỷ lệ 1:5000 trong PBS/Tween™/3% (khối lượng/thể tích) Albumin huyết thanh bò trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các đĩa được rửa ba lần trong 250 μ L PBS/0,05% (thể tích/thể tích) Tween™ 20 chứa Proclin (PBST chứa chất diệt khuẩn sinh học). 20 μ L PBS được bổ sung vào mỗi giếng và các đĩa được đậy bằng nắp màu đen và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trước khi đọc kết quả. Các đĩa được đọc kết quả bằng thiết bị huỳnh quang Cellomics Arrayscan ở bước sóng 594nm (sau 24 giờ) hoặc 488nm (sau 5 giờ) để xác định hàm

lượng thụ thể ER α ở mỗi giếng. Cường độ tổng số trung bình được chuẩn hóa theo số lượng tế bào để thu được cường độ tổng số tính trên một tế bào. Dữ liệu được phân tích bằng gói phần mềm thích hợp (như Origin) để thực hiện phân tích đường chuẩn thích hợp. Mức độ điều hòa ức chế biểu hiện thụ thể ER α được xác định bằng trị số IC₅₀ bằng cách tính toán nồng độ hợp chất cần có để làm giảm 50% cường độ tín hiệu trung bình tối đa.

Mặc dù đặc tính dược lý của hợp chất có công thức (I) thay đổi theo công thức cấu tạo, nhưng nhìn chung hoạt tính của hợp chất có công thức (I) có thể được xác định ở các nồng độ hoặc liều lượng dưới đây trong một hoặc nhiều thử nghiệm nêu trên.

Dữ liệu dưới đây được tạo ra đối với các ví dụ (dữ liệu này có thể là kết quả của một thử nghiệm duy nhất hoặc kết quả trung bình của nhiều thử nghiệm lặp lại).

Bảng A

Ví dụ	Ái lực gắn kết ER, trị số IC ₅₀	Mức độ điều hòa ức chế biểu hiện, trị số IC ₅₀
1	<0,64	0,14
2	1	0,85
3	1	0,4
4	1,6	0,99
5	0,2	0,57
6	<1,3	0,44
7	5	1,7
8	2,2	3
9	<1,2	1,5

Nghiên cứu ghép ngoại lai MCF-7 in vivo với hợp chất theo ví dụ 1 dưới dạng hoạt chất duy nhất và kết hợp với chất ức chế mTOR

Tế bào MCF7 (5×10^6 tế bào được tạo hỗn dịch trong 100 μ L môi trường RPMI) được cấy dưới da ở hông phía sau của chuột đã bị suy giảm miễn dịch (SCID) một ngày sau khi mỗi chuột được phẫu thuật cấy ghép với 0,5mg/21 ngày oestrogen dạng hạt nhỏ (Innovative Research, USA). Các khối u được đo hai lần một tuần và sự thay đổi về thể tích khối u và tác dụng ức chế sinh trưởng khối u được xác định bằng thước kẹp hai chiều Vernier (chiều dài x chiều rộng), trong đó chiều dài được xác định là chiều dài nhất trên khối u và chiều rộng là chiều vuông góc tương ứng. Thể tích khối u được đo theo công thức (chiều dài x chiều rộng) x $\sqrt{(\text{chiều dài} \times \text{chiều rộng}) \times \pi/6}$.

Các khối u được đo sau 13 ngày cấy ghép tế bào để chia ngẫu nhiên các chuột thành các nhóm thử nghiệm. Quá trình điều trị bằng hợp chất bắt đầu sau 14 ngày cấy ghép tế bào.

Chất ức chế mTOR AZD2014 được sử dụng cho các nhóm chuột khác nhau ở liều lượng bằng 15mg/kg một lần hàng ngày theo đường uống ở liều lượng bằng 0,1mL/10g. Hợp chất theo ví dụ 1 được sử dụng ở liều lượng bằng 5mg/kg một lần hàng ngày theo đường uống ở liều lượng bằng 0,1mL/10g. Một nhóm chuột được sử dụng giả dược theo đường uống đóng vai trò làm nhóm đối chứng. Chín chuột mỗi nhóm được sử dụng các hoạt chất cho nhóm đối chứng.

Dữ liệu thu được từ nghiên cứu này được thể hiện trong Fig.10.

Tác dụng hiệp đồng của hợp chất có công thức (I) với chất ức chế PI3K α/δ có thể được nghiên cứu theo cùng cách thức kết hợp với chất ức chế mTOR nêu trên.

Nghiên cứu hiệu quả ghép ngoại lai suy giảm estrogen kéo dài HCC1428 (HCC1428 LTED)

Sau khoảng thời gian nuôi cấy thích hợp, tế bào HCC1428 LTED (1×10^6) được cấy dưới da ở hông phía sau của chuột cái NSG đã bị suy giảm miễn dịch và cắt bỏ buồng trứng (Jackson Labs, USA). Các khối u được đo hai lần một tuần và sự thay đổi về thể tích khối u và tác dụng ức chế sinh trưởng khối u được xác định bằng thước kẹp hai chiều Vernier (chiều dài x chiều rộng), trong đó chiều dài được xác định là chiều dài nhất trên khối u và chiều rộng là chiều vuông góc tương ứng. Thể tích khối u được đo theo công thức (chiều dài x chiều rộng) x $\sqrt{(chiều dài x chiều rộng) \times (\pi/6)}$. Các khối u được đo một tuần một lần sau khi cấy ghép tế bào cho đến khi kích cỡ trung bình bằng 150 mm³ để chia ngẫu nhiên các chuột thành các nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm gồm 10 chuột. Quá trình điều trị bằng hợp chất bắt đầu sau 62 ngày nghiên cứu và một tuần một lần thể tích khối u tiếp tục được đo. Hợp chất theo ví dụ 1 được sử dụng ở liều lượng 25mg/kg một lần hàng ngày theo đường uống ở liều lượng bằng 0,1mL/10g. Một nhóm chuột khác được sử dụng giả dược theo đường uống đóng vai trò làm nhóm đối chứng.

Sau 28 ngày điều trị, thể tích khối u của các chuột đối chứng đã tăng trung bình 220mm³ (bằng các trị số trung bình hình học), trong khi đó thể tích khối u của các chuột được điều trị bằng hợp chất theo ví dụ 1 đã giảm 46mm³ tương ứng với tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng khối u bằng 121% ($P < 0,001$ bằng phép kiểm định T không bắt cặp).

Để đo hàm lượng protein thụ thể estrogen ở các khối u ghép ngoại lai, các mẫu khối u được thu nhận sau 24 giờ sử dụng liều cuối cùng của giả dược hoặc hợp chất theo ví dụ 1 và bảo quản đông lạnh trong nitơ lỏng. Để chiết xuất protein, mảnh khối u được bổ sung vào 700 μ L dung dịch đệm chiết tách tế bào Invitrogen (FNN0011) có bổ sung chất ức chế phosphatase Sigma (số 2 (P5726) và 3 (P0044) theo tỷ lệ pha loãng 1:100) và chất ức chế hoàn toàn protease Roche (11836145001) (1 viên nén/50mL), 1mM dithiothreitol (DTT) trong ống mẫu có dung tích 2mL trong nước đá. Các mẫu được làm đồng nhất hóa bằng Mixermill (level 27/giây) và 3 x 2 phút chu trình đồng nhất. Các mẫu được ly tâm nhanh để xác định mức độ đồng nhất hoàn toàn của khối u. Dịch treo đồng nhất được siêu âm trong 10 giây, sau đó ly tâm đảo ngược ở tốc độ bằng 13000 vòng/phút trong 15 phút. Hàm lượng protein trong phần dịch nổi được đo và khoảng 45 μ g protein được chạy trên Bis-Tris Gel 15 giếng (4-12% Gel) bằng các phương pháp chuẩn. Sau khi phân tách protein và chuyển lên màng lọc nitrocellulose, thụ thể estrogen 68kDa: kháng thể ThermoFisher SP1 #9101S được bổ sung vào, pha loãng theo tỷ lệ 1:400 trong sữa/PBS/T và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Màng lọc này được rửa trong 3x 5 phút trong khoảng 20mL TBS/T 0,05% và kháng thể thứ cấp phát hiện kháng IgG của thỏ được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong 5% marvel trong TBS/T và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tín hiệu được phát hiện bằng cơ chất kéo dài siêu tín hiệu phát quang hóa học và định lượng bằng phần mềm Syngene. Hàm lượng protein vinculin được đo dưới dạng mẫu đối chứng bằng V931 Sigma được pha loãng theo tỷ lệ 1:10000 trong marvel và kháng thể phát hiện kháng IgG của chuột. Kết quả trên Fig.11 và Fig.12 cho thấy rằng hàm lượng ER ở các chuột được điều trị bằng hợp chất theo ví dụ 1 đã giảm 60% so với mẫu đối chứng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng.

Tá dược được dụng thích hợp để bào chế viên nén bao gồm, ví dụ tá dược pha loãng trợ, tá dược tạo hạt và tá dược rã, tá dược dính, tá dược trơn, chất bảo quản và chất chống oxy hóa. Tá dược được dụng thích hợp khác bao gồm chất tạo phức chelat. Viên nén có thể được bao hoặc không được bao để biến đổi khả năng rã của chúng và hấp thu hoạt chất trong đường tiêu hóa, hoặc để cải thiện độ ổn định và/hoặc hình thái của chúng, khi sử dụng các quy trình bao và tá dược bao thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Theo cách khác, dược phẩm dùng theo đường uống có thể được bào chế ở dạng viên nang cứng gelatin, trong đó hoạt chất được trộn với tá dược pha loãng rắn trơ, hoặc dưới dạng viên nang mềm gelatin, trong đó hoạt chất được trộn với nước hoặc dầu.

Hỗn dịch thuốc nước thường chứa hoạt chất ở dạng bột mịn cùng với một hoặc nhiều chất gây thấm ổn định, chất phân tán hoặc chất hút ẩm. Hỗn dịch thuốc nước có thể còn chứa một hoặc nhiều chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất màu, chất thơm, và/hoặc chất làm ngọt.

Hỗn dịch thuốc dầu có thể được bào chế bằng cách tạo hỗn dịch hoạt chất trong dầu thực vật hoặc dầu khoáng. Hỗn dịch thuốc dầu có thể còn chứa chất làm đặc. Chất làm ngọt và chất thơm có thể được bổ sung vào để tạo ra dược phẩm dễ uống. Các dược phẩm này có thể được bảo quản bằng cách bổ sung chất chống oxy hóa.

Thuốc bột và thuốc cốm có thể phân tán thích hợp để bào chế hỗn dịch nước bằng cách bổ sung nước thường chứa hoạt chất cùng với chất phân tán hoặc hút ẩm, chất gây thấm ổn định và một hoặc nhiều chất bảo quản. Các dược phẩm này có thể còn chứa các tá dược khác chất làm ngọt, chất thơm và chất màu.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật hoặc dầu khoáng hoặc hỗn hợp của chúng. Nhũ tương thuốc có thể còn chứa chất làm ngọt, chất thơm và chất bảo quản.

Xirô và cốm thuốc ngọt cũng có thể được bào chế với chất làm ngọt, và có thể còn chứa chất chống viêm, chất bảo quản, chất thơm và/hoặc chất màu.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được bào chế ở dạng hỗn dịch thuốc tiêm dầu hoặc hỗn dịch thuốc tiêm nước vô trùng, theo quy trình đã biết sử dụng một hoặc nhiều chất phân tán hoặc hút ẩm và chất gây thấm ổn định thích hợp. Chế phẩm thuốc tiêm vô trùng cũng có thể được bào chế ở dạng hỗn dịch thuốc tiêm hoặc hỗn dịch thuốc tiêm vô trùng trong tá dược pha loãng hoặc hệ dung môi không độc thích hợp sử dụng theo đường tiêm .

Dược phẩm để sử dụng theo đường xông hít có thể được bào chế ở dạng thuốc phun mù được thiết kế để phân tán hoạt chất dưới dạng phun mù chứa hạt rắn mịn hoặc giọt lỏng. Các chất đẩy thông thường như flohydrocarbon hoặc hydrocarbon bay hơi có

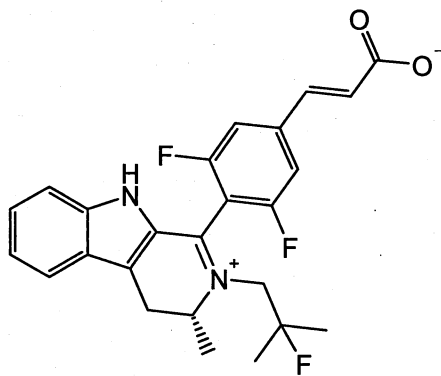
thể được sử dụng thiết bị khí dùng được thiết kế thuận tiện để phân phối lượng hoạt chất chính xác. Các dược phẩm xông hít chứa bột khô cũng có thể thích hợp.

Để biết thêm thông tin về các dược phẩm này, xem *Chapter 25.2 in Volume 5 of Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1, tức là axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic, hoặc muối được dụng của nó. Tốt hơn nếu, hợp chất theo ví dụ 1 có mặt ở dạng tinh thể B.

Quy trình điều chế axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic như được thể hiện trong ví dụ 1, cần được thực hiện trong điều kiện tránh ánh sáng và trong điều kiện khí nitơ để tránh tạo sản phẩm phân hủy.

Sản phẩm phân hủy của hợp chất nêu trên là (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat, có công thức như sau:



và có thể được tạo ra từ hợp chất theo ví dụ 1, tức là axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic bằng phản ứng tự oxy hóa trong không khí theo cơ chế gốc tự do. Để tránh nghi ngờ, sản phẩm phân hủy này được cho là gần như không có tác dụng điều hòa ức chế biểu hiện chọn lọc thụ thể estrogen.

Hợp chất này cũng có thể là (E)-3-[3,5-điflo-4-[(3R)-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl]phenyl]prop-2-enoat và được điều chế theo ví dụ 13.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng việc kiểm soát sự hình thành các sản phẩm phân hủy là cần thiết để sản xuất và bảo quản an toàn dược phẩm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng một số hợp chất có thể phân hủy khi bảo quản, ngay sau khi bào chế thành dược phẩm, và trong một số trường hợp sản phẩm phân hủy có thể được kiểm soát bằng cách sử dụng tá dược thích hợp trong dược phẩm và/hoặc bằng quy trình thích hợp để đóng gói thành phẩm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng thuốc thành phẩm để bán trên thị trường sẽ cần phải được tối ưu hóa cho một số đặc tính, bao gồm độ ổn định hóa học, độ ổn định vật lý và đặc tính hòa tan. Do đó, các dược phẩm này sẽ được phát triển để làm cân bằng một số yếu tố khác nhau.

Tốt hơn nữa, dược phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-methylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic, hoặc muối dược dụng của nó, còn chứa chất chống oxy hóa.

Chất chống oxy thích hợp để dùng trong dược phẩm đã biết trong lĩnh vực này, và bao gồm, ví dụ axeton natri bisulfit; axit alpha lipoic; alpha tocopherol; axit ascorbic; ascorbyl palmitat; butylhydroxyanisol; butylhydroxytoluen; caroten; axit xitric monohydrat; dodecyl galat; axit erythorbic; axit fumaric; glutathion; histidin; axit hypophosphorơ; axit lactobionic; axit lipoic; axit malic; melatonin; metionin; d-manoza; monothioglycerol; octyl galat; kali metabisulfit; axit propionic; propyl galat; natri ascorbat; natri bisulfit; natri formaldehyt sulfoxylat; natri metabisulfit; natri sulfit; natri thiosulfat; thiếc clorua; lưu huỳnh đioxit; thymol; tocopherol; tocotrienol; ubiquinol; axit uric; vitamin E; và vitamin E polyetylen glycol succinat. Các hợp chất này có thể tạo ra tác dụng chống oxy hóa theo nhiều cơ chế và một hoặc nhiều cơ chế này có thể hiệu quả hơn cho hợp chất cụ thể. Một số chất chống oxy hóa hợp chất, như BHA, đóng vai trò là chất loại gốc tự do. Các chất chống oxy hóa khác, như natri metabisulfit và axit ascorbic dễ bị oxy hóa và do đó có thể bị oxy hóa dễ hơn hoạt chất.

Ví dụ, khi kim loại gây ra sự hình thành peroxit tham gia vào cơ chế oxy hóa, thì việc sử dụng chất tạo phức chelat, như, ví dụ EDTA (etylendi-amintetraaxit axetic), có thể hữu ích để loại bỏ tạp chất kim loại bất kỳ và nhờ đó đạt được tác dụng làm ổn định một cách gián tiếp. Các chất tạo phức chelat với kim loại khác đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ betadex sulfobutyl ete natri; canxi axetat; axit xitric monohydrat; xyclodextrin; đinatri edetat; axit edetic; axit fumaric; galactosa; axit glutamic; histidin;

hydroxypropyl betadex; axit malic; axit pentetic; phytochelatins; poly(methyl vinyl ete/maleic anhydrit); kali xitrat; natri xitrat đihydrat; natri phosphat đibazơ; natri phosphat monobazơ; axit tartaric; và trehaloza.

Dược phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 có thể chứa propyl galat, natri metabisulfit, axit ascorbic và butylhydroxyanisol. Dược phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 cũng có thể chứa EDTA, ví dụ cụ thể về dược phẩm này được mô tả trong ví dụ 12. Trong số này, dược phẩm chứa natri metabisulfit có độ ổn định thấp hơn dược phẩm không chứa chất chống oxy hóa, sau 4 tuần bảo quản ở nhiều điều kiện nhiệt độ và độ ẩm. Dược phẩm chứa axit ascorbic là ổn định nhất sau 4 tuần bảo quản ở nhiều điều kiện nhiệt độ và độ ẩm (như được xác định bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng, ví dụ UHPLC).

Các tá dược thích hợp khác để bào chế dược phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1, bao gồm tá dược có hàm lượng kim loại thấp, tá dược có hàm lượng peroxit thấp, tá dược như manitol mà là chất loại gốc tự do cũng như tá dược độn. Quy trình bào chế dược phẩm này có thể cũng ảnh hưởng đến độ ổn định, ví dụ đối với một số hoạt chất, việc đảm bảo trộn kỹ hoạt chất với tá dược tạo ra độ ổn định có thể quan trọng trong việc đảm bảo độ ổn định tối đa. Việc trộn kỹ này có thể bị ảnh hưởng bởi, ví dụ tốc độ trộn, kích cỡ hạt và các quy trình trộn/tạo hạt ướt hoặc khô. Hoạt chất có thể được tạo hạt với chất chống oxy hóa, sau đó trộn với các tá dược khác. Chất chống oxy hóa có thể còn được bổ sung vào màng bao bên ngoài bất kỳ của dược phẩm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và chất chống oxy hóa. Tốt hơn nếu, axit ascorbic được sử dụng làm chất chống oxy hóa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và chất tạo phức chelat với kim loại. Tốt hơn nếu, EDTA được sử dụng làm chất tạo phức chelat với kim loại.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, chất chống oxy hóa và tùy ý còn chứa chất tạo phức chelat với kim loại.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng, trong đó được phẩm này chứa ít hơn 5% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng, trong đó được phẩm này chứa ít hơn 2% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng, trong đó được phẩm này chứa ít hơn 1% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng, trong đó được phẩm này chứa ít hơn 0,5% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá được

pha loãng được dụng, trong đó được phẩm này chứa ít hơn 0,1% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một chất mang hoặc tá được pha loãng được dụng, trong đó được phẩm này chứa ít hơn 0,05% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.

Theo các khía cạnh nêu trên, khi được phẩm theo sáng chế chứa ít hơn 5% khối lượng/khối lượng, 2% khối lượng/khối lượng, 1% khối lượng/khối lượng, 0,5% khối lượng/khối lượng, 0,1% khối lượng/khối lượng hoặc 0,05% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng thuật ngữ này có nghĩa là tỷ lệ phần trăm khối lượng của axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic có trong được phẩm.

Do đó, sản phẩm phân hủy (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat có thể được sử dụng làm chất chỉ thị hoặc chất chuẩn trong các phương pháp phân tích như HPLC để kiểm soát độ ổn định của hợp chất theo ví dụ 1 hoặc được phẩm chứa hợp chất này.

Lượng hoạt chất tức là kết hợp với một hoặc nhiều tá được để tạo ra dạng bào chế đơn liều sẽ cần thay đổi phụ thuộc vào đối tượng cần điều trị và đường đưa thuốc cụ thể., ví dụ để sử dụng theo đường uống cho người sẽ thường cần, ví dụ nằm trong khoảng từ 1mg đến 2g hoạt chất (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 100mg đến 2g, ví dụ nằm trong khoảng từ 250mg đến 1,8g, như nằm trong khoảng từ 500mg đến 1,8g, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 500mg đến 1,5g, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 500mg đến 1g) kết hợp với lượng tá được thích hợp có thể thay đổi nằm trong khoảng từ 3 đến 98% khối lượng của tổng chế phẩm. Cần hiểu rằng, khi liều lượng lớn cần sử dụng, thì dạng bào chế đa liều có thể được sử dụng, ví dụ hai hoặc nhiều viên nén hoặc viên nang, với liều lượng của hoạt chất được chia thích hợp trong đó. Thông thường, dạng bào chế đơn vị

chứa hợp chất theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 10mg đến 0,5g, mặc dù dạng bào chế đơn vị có thể chứa lên đến 1g. Tốt hơn nếu, dạng bào chế rắn đơn liều chứa hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 1mg đến 300mg.

Liều lượng để điều trị hoặc phòng ngừa của hợp chất theo sáng chế sẽ thay đổi theo bản chất và mức độ nghiêm trọng của bệnh, độ tuổi và giới tính của động vật hoặc đối tượng bị bệnh và đường đưa thuốc cụ thể, theo theo các nguyên lý y học đã biết.

Để điều trị hoặc phòng ngừa, hợp chất theo sáng chế sẽ thường được sử dụng với liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 100mg/kg thể trọng đối tượng bị bệnh, khi cần chia liều. Nhìn chung, liều thấp sẽ được sử dụng khi đường tiêm được sử dụng. Do đó, ví dụ để sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch, liều nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 25mg/kg thể trọng sẽ được sử dụng. Tương tự, để sử dụng theo đường xông hít, liều nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 25mg/kg thể trọng sẽ được sử dụng. Tuy nhiên, đường uống được ưu tiên, đặc biệt là ở dạng viên nén.

Theo một khía cạnh, hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó, được sử dụng dưới dạng viên nén chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 10mg đến 100mg, trong đó một hoặc nhiều viên nén được sử dụng khi cần để đạt được liều lượng mong muốn.

Như nêu trên, đã biết rằng quá trình truyền tín hiệu qua trung gian $ER\alpha$ gây ra khối u bởi một hoặc nhiều tác động điều hòa sự tăng sinh tế bào ung thư và các tế bào khác, điều hòa các yếu tố tạo mạch và điều hòa sự di chuyển, di căn và xâm lấn của tế bào ung thư. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng hợp chất theo sáng chế có hoạt tính chống khối u rất mạnh bằng cách đối kháng và điều hòa giảm $ER\alpha$ tức là tham gia vào các quá trình truyền tín hiệu mà tạo ra khả năng tăng sinh và sống sót của tế bào khối u và khả năng xâm lấn và di chuyển của tế bào khối u di căn.

Theo đó, hợp chất theo sáng chế là hoạt chất kháng khối u rất hữu hiệu, đặc biệt là hợp chất theo sáng chế là chất ức chế chọn lọc sự tăng sinh, sống sót, di chuyển, di căn và xâm lấn của tế bào ung thư ở động vật có vú dẫn đến ức chế sự phát triển và sống sót của khối u và ức chế sự phát triển của khối u di căn. Đặc biệt là, hợp chất theo sáng chế có thể hữu ích để dùng làm hoạt chất chống tăng sinh và xâm lấn trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn. Đặc biệt là, hợp chất theo sáng chế có thể hữu ích trong phòng ngừa hoặc điều trị khối u nhạy cảm với chất ức chế $ER\alpha$ và tham gia vào các quá trình

truyền tín hiệu mà tạo ra khả năng tăng sinh và sống sót của tế bào khối u và khả năng di chuyển và xâm lấn của tế bào khối u di căn. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể hữu ích trong phòng ngừa hoặc điều trị khối u được điều hòa riêng hoặc một phần bởi sự đối kháng hoặc điều hòa giảm ER α , tức là hợp chất có thể được sử dụng để tạo ra tác dụng ức chế ER α ở động vật máu nóng cần điều trị.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để dùng làm thuốc ở động vật máu nóng, như người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, dùng để tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng, như người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để dùng làm chất chống xâm lấn ở động vật máu nóng, như người trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, để tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong sản xuất thuốc để tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong sản xuất thuốc để dùng làm chất chống xâm lấn ở động vật máu nóng, như người trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp tạo ra tác dụng chống xâm lấn bằng cách phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn cho động vật máu nóng cần điều trị, như người bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư động vật máu nóng như người.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh khối u rắn ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh khối u rắn ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh khối u rắn ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để phòng ngừa hoặc điều trị khối u nhạy cảm với chất ức chế ER α tham gia vào các quá trình truyền tín hiệu tạo ra khả năng tăng sinh, sống sót, xâm lấn và di căn của tế bào khối u.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để phòng ngừa hoặc điều trị khối u nhạy cảm với chất ức chế ER α tham gia vào các quá trình truyền tín hiệu tạo ra khả năng tăng sinh, sống sót, xâm lấn và di căn của tế bào khối u.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị khối u nhạy cảm với chất ức chế ER α tham gia vào các quá trình truyền tín hiệu tạo ra khả năng tăng sinh, sống sót, xâm lấn và di căn của tế bào khối u, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để tạo ra tác dụng ức chế ER α .

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để tạo ra tác dụng ức chế ER α .

Sáng chế cũng mô tả phương pháp tạo ra tác dụng ức chế ER α , bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để tạo ra tác dụng ức chế chọn lọc ER α .

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để tạo ra tác dụng ức chế chọn lọc ER α .

Sáng chế cũng mô tả phương pháp tạo ra tác dụng ức chế chọn lọc ER α , bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Hợp chất theo sáng chế có thể gắn kết với vùng gắn kết phối tử ER α và phân giải chọn lọc thụ thể estrogen. Trong các thử nghiệm sinh hóa và tế bào, hợp chất theo sáng chế có khả năng gắn kết thụ thể estrogen và làm giảm lượng ER α trong tế bào rất hữu hiệu, do đó hữu ích trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh nhạy cảm với estrogen (bao gồm bệnh ung thư đã kháng liệu pháp điều trị nội tiết), tức là dùng để điều trị bệnh ung thư vú và bệnh ung thư cơ quan sinh dục (bao gồm bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư buồng trứng và bệnh ung thư cổ tử cung) và bệnh ung thư biểu hiện protein ER α đột biến mà có thể đột biến một lần nữa hoặc tăng đột biến khi điều trị trước bằng liệu pháp điều trị nội tiết, như chất ức chế aromataza.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để điều trị bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để điều trị bệnh ung thư vú.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để điều trị bệnh ung thư vú, trong đó bệnh ung thư này đã kháng một hoặc nhiều phương pháp điều trị nội tiết khác.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư vú, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư vú, trong đó bệnh ung thư này đã kháng một hoặc nhiều phương pháp điều trị nội tiết khác, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư vú.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư vú, trong đó bệnh ung thư này đã kháng một hoặc nhiều phương pháp điều trị nội tiết khác.

Theo một khía cạnh, bệnh ung thư cần điều trị là bệnh ung thư vú. Theo một khía cạnh khác, bệnh ung thư vú là bệnh biểu hiện thụ thể estrogen. Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) được sử dụng kết hợp với chất chống ung thư khác, như chất kháng hormon.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó dùng để điều trị bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Như nêu trên, tác dụng *in vivo* của hợp chất có công thức (I) có thể được tạo ra một phần bởi một hoặc nhiều chất chuyển hóa được tạo ra trong cơ thể người hoặc động vật sau khi sử dụng hợp chất có công thức (I).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế ER- α ở đối tượng bị bệnh, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh sử dụng lượng của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, hữu hiệu để ức chế ER- α ở đối tượng bị bệnh.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế ER- α ở đối tượng bị bệnh, bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh sử dụng lượng của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, hữu hiệu để ức chế ER- α ở đối tượng bị bệnh.

Trong toàn bộ các phương pháp và sử dụng nêu trên, hợp chất có công thức (I) thích hợp là hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó. Theo một khía cạnh, hợp chất theo ví dụ 1 là ở dạng tinh thể B.

Phương pháp điều trị bệnh ung thư theo sáng chế có thể là liệu pháp duy nhất hoặc ngoài hợp chất theo sáng chế có thể còn bao gồm liệu pháp phẫu thuật, xạ trị hoặc hóa trị. Liệu pháp hóa trị bao gồm một hoặc nhiều hoạt chất chống khối u sau:

(i) hoạt chất chống ung thư/chống tăng sinh khác và hỗn hợp của chúng, như được sử dụng trong lĩnh vực điều trị bệnh ung thư, như hoạt chất alkyl hóa (ví dụ cis-platin, oxaliplatin, carboplatin, cyclophosphamid, nitơ mù tạc, melphalan, chlorambucil, busulphan, temozolamid và nitrosoure); chất chống chuyển hóa (ví dụ gemcitabin và chất kháng folat như flopyrimidin như 5-flouraxil và tegafur, raltitrexed, methotrexat, xytosin arabinosit, và hydroxyurea); kháng sinh chống khối u (ví dụ anthracyclin như adriamycin, bleomycin, doxorubicin, daunomycin, epirubicin, idarubicin, mitomycin-C,

dactinomycin và mithramycin); chất chống giãn phân (ví dụ alkaloid của cây dừa cạn như vincristin, vinblastin, vindesin và vinorelbin và dẫn xuất taxol như taxol và taxotere và chất ức chế polokinaza); và chất ức chế topoisomeraza (ví dụ epipodophylotoxin như etoposid và teniposit, amsacrin, topotecan và camptothecin);

(ii) hoạt chất kháng hormon như chất kháng oestrogen (ví dụ tamoxifen, fulvestrant, toremifen, raloxifen, droloxifen và iotxyfen), progestogen (ví dụ megestrol axetat), chất ức chế aromataza (ví dụ anastrozol, letrozol, vorazol và exemestan);

(iii) hoạt chất ức chế yếu tố tăng trưởng và truyền tín hiệu giảm của chúng: bao gồm kháng thể điều hòa yếu tố tăng trưởng hoặc thụ thể của yếu tố tăng trưởng bất kỳ được mô tả trong tài liệu: Stern *et al. Critical Reviews in Oncology/Haematology*, 2005, 54, pp11-29); chất ức chế phân tử nhỏ của các đích này, ví dụ chất ức chế kinaza, bao gồm kháng thể kháng erbB2 trastuzumab [Herceptin™], kháng thể kháng EGFR panitumumab, kháng thể kháng EGFR cetuximab [Erbix, C225] và chất ức chế tyrosin kinaza bao gồm chất ức chế họ thụ thể erbB, như chất ức chế họ thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (ví dụ FR/erbB1) tyrosin kinaza như gefitinib hoặc erlotinib, erbB2 tyrosin kinaza như lapatinib, và chất ức chế tổ hợp erb1/2 như afatinib; các hoạt chất tương tự tác động đến các yếu tố tăng trưởng khác và thụ thể của chúng, ví dụ chất ức chế yếu tố tăng trưởng tế bào gan hoặc thụ thể của nó bao gồm c-met và Ron; chất ức chế insulin và yếu tố tăng trưởng insulin hoặc thụ thể của nó (IGFR, IR) chất ức chế yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu hoặc thụ thể của nó (PDGFR), và chất ức chế quá trình truyền tín hiệu điều hòa bởi các thụ thể tyrosin kinaza khác như c-kit, AnLK, và CSF-1R; chất điều hòa hướng đích protein truyền tín hiệu trong quá trình truyền tín hiệu PI3-kinaza, ví dụ chất ức chế các dạng tương đồng PI3-kinaza như PI3K- $\alpha/\beta/\gamma$ và ser/thr kinaza như AKT, mTOR (như AZD2014), PDK, SGK, PI4K hoặc PIP5K; chất ức chế serin/threonin kinaza không được thể hiện ở trên, ví dụ chất ức chế raf như vemurafenib, chất ức chế MEK như selumetinib (AZD6244), chất ức chế Abl như imatinib hoặc nilotinib, chất ức chế Btk như ibrutinib, chất ức chế Syk như fostamatinib, chất ức chế aurora kinaza (ví dụ AZD1152), chất ức chế ser/thr kinaza khác như JAK, STAT và IRAK4, và chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin như palbociclib;

iv) hoạt chất điều hòa truyền tín hiệu phá hủy ADN, ví dụ chất ức chế PARP (ví dụ Olaparib), chất ức chế ATR hoặc chất ức chế ATM; v) chất điều hòa quá trình gây chết

tế bào và gây chết tế bào theo chương trình như chất điều hòa họ Bcl (ví dụ ABT-263/Navitoclax, ABT-199);

(vi) hoạt chất chống tạo mạch như hoạt chất ức chế yếu tố tăng trưởng nội mô mạch, [ví dụ kháng thể kháng yếu tố tăng trưởng tế bào nội mô mạch bevacizumab (Avastin™) và chất ức chế thụ thể VEGF tyrosin kinaza như sorafenib, axitinib, pazopanib, sunitinib và vandetanib (và hợp chất tác động theo các cơ chế khác (ví dụ linomit, chất ức chế integrin $\alpha\beta 3$ và angiostatin)];

(vii) hoạt chất phá hủy mạch máu, như Combretastatin A4;

(viii) hoạt chất chống xâm lấn, ví dụ chất ức chế c-Src kinaza như (dasatinib, J. Med. Chem, 2004, 47, 6658-6661) và bosutinib (SKI-606), và chất ức chế metalloproteinaza như marimastat, chất ức chế thụ thể hoạt hóa plasminogen urokinaza hoặc kháng thể kháng Heparanaza];

(ix) hoạt chất miễn dịch, bao gồm, ví dụ hoạt chất làm tăng khả năng miễn dịch *ex vivo* và *in vivo* với tế bào khối u cho đối tượng bị bệnh, như cấy ghép với xytokin như interleukin 2, interleukin 4 hoặc yếu tố kích thích tạo bạch cầu hạt-đại thực bào, hoạt chất ức chế suy giảm tế bào T, tế bào miễn dịch chuyển gen như tế bào đuôi gai chuyển gen xytokin, tế bào khối u chuyển gen xytokin và kháng thể kháng idiotip, ví dụ cụ thể bao gồm kháng thể đơn dòng kháng PD-1 (ví dụ BMS-936558) hoặc CTLA4 (ví dụ ipilimumab và tremelimumab);

(x) hoạt chất đổi mã hoặc gây nhiễu ARN, ví dụ hoạt chất đổi mã các đích nêu trên.

(xi) liệu pháp gen, bao gồm, ví dụ liệu pháp thay thế gen đột biến như gen đột biến p53 hoặc gen đột biến BRCA1 hoặc BRCA2, GDEPT (tiền dược chất enzym hướng đích gen) như xytosin deaminaza, thymidin kinaza hoặc nitroreductaza vi khuẩn và liệu pháp làm khả năng dung nạp của đối tượng bị bệnh với liệu pháp hóa trị hoặc xạ trị như liệu pháp gen kháng nhiều thuốc.

Theo khía cạnh này, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo sáng chế hoặc muối dược dụng của nó và chất kháng khối u khác, cụ thể hoạt chất chống khối u bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (i) đến (xi). Cụ thể, hoạt chất chống khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (i) đến (xi) là các dược

chất thiết yếu để điều trị bệnh ung thư; người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu ý nghĩa của thuật ngữ “được chất thiết yếu”. Theo một khía cạnh, hợp chất theo sáng chế là hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u khác, đặc biệt là chất kháng khối u được chọn từ một trong số các nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo ví dụ 1 [axit (E)-3-(3,5-đifloro-4-((1R,3R)-2-(2-fluor-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic] hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u khác, đặc biệt là chất kháng khối u được chọn từ một trong số các nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u khác, đặc biệt là chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (i).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó và chất chống khối u bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (i).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất chống khối u bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (i).

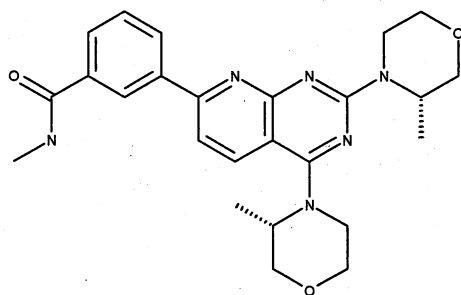
Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó và dẫn xuất taxol, như, ví dụ taxol hoặc taxotere, taxotere thích hợp., ví dụ hợp chất thích hợp theo sáng chế kết hợp với dẫn xuất taxol, như, ví dụ taxol hoặc taxotere, taxotere thích hợp là hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u khác, đặc biệt là chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (ii).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó và chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và chất ức chế mTOR, như AZD2014 (ví dụ xem tài liệu sáng chế số WO2008/023161).



AZD2014

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó và chất ức chế PI3K α , như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, ví dụ về một chất ức chế PI3K α thích hợp là hợp chất theo ví dụ 3 được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, mà là hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on, hoặc muối được dụng của nó. Hợp chất theo ví dụ 3 của tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163 được điều chế trong ví dụ đối chiếu 1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và palbociclib.

Theo một khía cạnh, chế phẩm kết hợp nêu trên chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó, và chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc chất ức chế mTOR (như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3K- α (như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 3) hoặc palbociclib, thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục, như

bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, đặc biệt là bệnh ung thư vú, như bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Khi thuật ngữ “kết hợp” được sử dụng cần hiểu rằng thuật ngữ này chỉ việc sử dụng đồng thời, việc sử dụng riêng hoặc việc sử dụng luân phiên. Theo một khía cạnh khác “kết hợp” được dùng trong bản mô tả để chỉ việc sử dụng đồng thời. Theo một khía cạnh khác “kết hợp” được dùng trong bản mô tả để chỉ việc sử dụng riêng. Theo khía cạnh khác, thuật ngữ “kết hợp” được dùng trong bản mô tả để chỉ việc sử dụng luân phiên. Khi việc sử dụng là luân phiên hoặc riêng biệt, thì thành phần thứ hai cần được sử dụng trong khoảng thời gian thích hợp để không làm mất tác dụng có lợi khi sử dụng kết hợp. Khi hai hoặc nhiều thành phần được sử dụng kết hợp riêng hoặc luân phiên, cần hiểu rằng chế độ liều đối với mỗi thành phần có thể khác và độc lập với các thành phần còn lại. Tốt hơn nếu, hợp chất theo sáng chế được sử dụng một lần hàng ngày.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi), và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 [axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic] hoặc muối được dùng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi), và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó kết hợp với chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii) và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dùng của nó và chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii); và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và chất ức chế mTOR, như AZD2014 (ví dụ xem tài liệu sáng chế số WO2008/023161); và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó và chất ức chế PI3K α , như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng, ví dụ về một chất ức chế PI3K α thích hợp là hợp chất theo ví dụ 3 được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và palbociclib và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng.

Theo một khía cạnh, được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó, và chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc chất ức chế mTOR (như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3K- α (như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 3) hoặc palbociclib, thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục, như bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, đặc biệt là bệnh ung thư vú, như bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi), và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii) và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất

từ (i) đến (xi), và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii); và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và chất ức chế mTOR, như AZD2014 (ví dụ xem tài liệu sáng chế số WO2008/023161); và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó và chất ức chế PI3K α , như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng dùng để điều trị bệnh ung thư, ví dụ về một chất ức chế PI3K α thích hợp là hợp chất theo ví dụ 3 được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó và palbociclib và chất mang hoặc tá dược pha loãng được dụng dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó, và chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc chất ức chế mTOR (như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3K- α (như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 3) hoặc palbociclib, thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục, như bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, đặc biệt là bệnh ung thư vú, như bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi), trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi), trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii) trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii); trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất ức chế mTOR, như AZD2014 (ví dụ xem tài liệu sáng chế số WO2008/023161); trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất ức chế PI3K α , như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, ví dụ về một chất ức chế PI3K α thích hợp là hợp chất theo ví dụ 3 được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với palbociclib trong sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người.

Việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc chất ức chế mTOR (như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3K- α (như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, đặc biệt là hợp chất theo ví dụ 3) hoặc palbociclib, thích hợp để dùng trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh

đục, như bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, đặc biệt là bệnh ung thư vú, như bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ một trong số các nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ một trong số các nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng hormon bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), ví dụ chất kháng oestrogen bất kỳ được chọn từ nhóm hoạt chất (ii), hoặc, ví dụ chất ức chế aromataza được chọn từ nhóm hoạt chất (ii).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của , ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất ức chế mTOR, như AZD2014 (ví dụ xem tài liệu sáng chế số WO2008/023161).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo ví dụ 1, hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất ức chế PI3K α , như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163, ví dụ về một chất ức chế PI3K α thích hợp là hợp chất theo ví dụ 3 được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, như người, cần điều trị, bao gồm bước cho động vật này sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với palbociclib.

Các phương pháp điều trị bệnh ung thư nêu trên là các phương pháp để điều trị bệnh ung thư vú hoặc bệnh ung thư cơ quan sinh dục, như bệnh ung thư vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, đặc biệt là bệnh ung thư vú, như bệnh ung thư vú biểu hiện thụ thể estrogen.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ một trong số các nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (i) hoặc (ii).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa:

- a) hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó được bào chế ở dạng thuốc thứ nhất;
- b) chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi) được bào chế ở dạng thuốc thứ hai; và
- c) đồ chứa để chứa dạng thuốc thứ nhất và dạng thuốc thứ hai.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa:

- a) hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó được bào chế ở dạng thuốc thứ nhất;
- b) chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (i) đến (ii) được bào chế ở dạng thuốc thứ hai; và
- c) đồ chứa để chứa dạng thuốc thứ nhất và dạng thuốc thứ hai.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối được dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ một trong số các nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối dược dụng của nó kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (i) hoặc (ii).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa:

- a) hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối dược dụng của nó được bào chế ở dạng thuốc thứ nhất;
- b) chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất từ (i) đến (xi) được bào chế ở dạng thuốc thứ hai; và
- c) đồ chứa để chứa dạng thuốc thứ nhất và dạng thuốc thứ hai.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa:

- a) hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối dược dụng của nó được bào chế ở dạng thuốc thứ nhất;
- b) chất kháng khối u được chọn từ nhóm hoạt chất (i) đến (ii) được bào chế ở dạng thuốc thứ hai; và
- c) đồ chứa để chứa dạng thuốc thứ nhất và dạng thuốc thứ hai.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit chứa:

- a) hợp chất theo ví dụ 1 hoặc muối dược dụng của nó được bào chế ở dạng thuốc thứ nhất;
- b) chất kháng khối u được chọn từ AZD2014, chất ức chế PI3K α (như chất ức chế PI3K α được mô tả trong tài liệu sáng chế số PCT/GB2014/050163) và palbociclib được bào chế ở dạng thuốc thứ hai; và
- c) đồ chứa để chứa dạng thuốc thứ nhất và dạng thuốc thứ hai.

Trong toàn bộ các phương pháp, sử dụng nêu trên và các khía cạnh khác, khi hợp chất theo ví dụ 1 được sử dụng, tốt hơn nếu hợp chất này là dạng tinh thể B.

Liệu pháp kết hợp nêu trên có thể là liệu pháp dược chất thiết yếu hàng đầu được thực hiện theo quy định kê đơn thông thường.

Mặc dù hợp chất có công thức (I) là hợp chất hữu hiệu để dùng cho động vật máu nóng (bao gồm người), nhưng hợp chất này cũng hữu ích khi cần ức chế ER- α . Do đó,

hợp chất này hữu ích làm chất chuẩn để phát triển các thử nghiệm sinh học và được chất mới.

Sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất theo sáng chế

Một khía cạnh khác sáng chế là dựa trên việc xác định mối liên hệ giữa tính trạng của gen mã hóa ER α và khả năng nhạy cảm để điều trị bằng hợp chất có công thức (I). Cụ thể, tính trạng của gen ER α có thể cho thấy đối tượng bị bệnh có khả năng đáp ứng thấp với liệu pháp hormon hiện nay (như chất ức chế aromataza), ít nhất một phần do một số đột biến ER α được cho là nguyên nhân phát sinh cơ chế kháng các phương pháp điều trị hiện nay. Sau đó, SERD, đặc biệt là SERD mà có thể được dùng theo đường uống với liều lượng lớn có hoạt lực mà không gây ra tác dụng không mong muốn quá mức có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng bị bệnh có đột biến ER α mà có thể kháng các liệu pháp khác. Do đó, hoạt chất này tạo ra kỹ thuật, phương pháp và công cụ để sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), đặc biệt là người bị bệnh ung thư. Sáng chế mô tả phương pháp và công cụ sàng lọc đối tượng bị bệnh (bao gồm liệu pháp điều trị theo từng đối tượng). Nguyên lý sàng lọc là dựa trên việc liệu tế bào khối u cần điều trị mang gen ER α thể đại hoặc gen ER α đột biến. Do đó, tính trạng của gen ER α có thể được sử dụng làm chỉ thị sinh học để sàng lọc phương pháp điều trị bằng SERD có thể có lợi. Để tránh nghi ngờ, hợp chất có công thức (I) theo sáng chế được cho là có cùng hoạt tính kháng gen ER α thể đại hoặc gen ER α đột biến, ít nhất là các đột biến của gen ER α được xác định ở thời điểm nộp đơn sáng chế này.

Do đó, cần có chỉ thị sinh học để sàng lọc đối tượng bị bệnh có khối u sẽ đáp ứng để điều trị bằng SERD, như hợp chất có công thức (I). Chỉ thị sinh học để sàng lọc đối tượng bị bệnh có khả năng đáp ứng với một hoạt chất mạnh hơn một hoạt chất khác là rất hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, do chúng làm giảm tác dụng không mong muốn của các hoạt chất này ở đối tượng bị bệnh có khối u không đáp ứng điều trị.

Chỉ thị sinh học có thể được xác định là “hợp chất được định lượng và đánh giá dưới dạng chất chỉ thị cho các quá trình sinh học bình thường, quá trình bệnh lý, hoặc đáp ứng dược học với liệu pháp điều trị can thiệp”. Chỉ thị sinh học là chất có thể phát hiện và đo được liên quan đến tình trạng bệnh hoặc bệnh cụ thể khi có mối tương quan giữa sự có mặt hoặc hàm lượng của chỉ thị sinh học với một số dấu hiệu của tình trạng bệnh hoặc bệnh (bao gồm sự có mặt, mức độ hoặc mức độ thay đổi của loại, giai đoạn của mức độ

nhạy cảm với tình trạng bệnh hoặc bệnh, hoặc đáp ứng với thuốc được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh hoặc bệnh). Mỗi tương quan này có thể định tính, định lượng, hoặc định tính và định lượng đồng thời. Thông thường, chỉ thị sinh học là hợp chất, mảnh hợp chất hoặc nhóm hợp chất. Các hợp chất này có thể là hợp chất bất kỳ có trong hoặc được tạo ra bởi cơ quan trong cơ thể, bao gồm protein (và peptit), axit nucleic và các hợp chất khác.

Chỉ thị sinh học có thể có hiệu quả dự đoán, và có thể được sử dụng để dự đoán hoặc phát hiện sự có mặt, mức độ, loại hoặc giai đoạn của tình trạng bệnh hoặc bệnh cụ thể (bao gồm sự có mặt hoặc hàm lượng của vi sinh vật hoặc độc tố cụ thể), mức độ nhạy cảm (bao gồm mức độ nhạy cảm di truyền) với tình trạng bệnh hoặc bệnh cụ thể, hoặc đáp ứng với phương pháp điều trị cụ thể (bao gồm phương pháp điều trị bằng thuốc). Người ta cho rằng chỉ thị sinh học sẽ đóng vai trò ngày càng quan trọng trong nghiên cứu và phát triển thuốc mới, bằng cách cải thiện hiệu quả của chương trình nghiên cứu và phát triển. Chỉ thị sinh học có được sử dụng làm hoạt chất chẩn đoán, hoạt chất kiểm soát tiến triển bệnh, hoạt chất kiểm soát điều trị và hoạt chất dự đoán kết quả lâm sàng, ví dụ nhiều nghiên cứu về chỉ thị sinh học đã được thực hiện để tìm ra các chỉ thị đặc hiệu cho các bệnh ung thư, bệnh tim mạch và bệnh miễn dịch thường gặp. Người ta tin rằng việc phát triển các chỉ thị sinh học thế hệ mới sẽ làm giảm đáng kể chi phí chăm sóc sức khỏe và phát triển thuốc mới đồng thời cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị nhiều bệnh và tình trạng bệnh.

Để thiết kế tối ưu các thử nghiệm lâm sàng và thu được các thông tin có giá trị nhất từ các thử nghiệm này, thì chỉ thị sinh học có thể được sử dụng. Chỉ thị này có thể đo được trong mô khối u hoặc mẫu thay thế. Tốt hơn nếu, các chỉ thị này cũng sẽ tương quan với hiệu quả điều trị, do đó cuối cùng có thể được sử dụng để sàng lọc đối tượng bị bệnh.

Do đó, vấn đề kỹ thuật bất cập theo khía cạnh này của sáng chế là xác định các phương pháp để sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất có công thức (I). Vấn đề kỹ thuật bất cập này được giải quyết bằng các phương án được thể hiện ở bộ yêu cầu bảo hộ và/hoặc phần mô tả của sáng chế.

Khối u chứa gen ER α thể đại được cho là nhạy cảm để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), ví dụ dưới dạng liệu pháp điều trị thứ nhất. Các khối u cũng có thể đáp ứng

để điều trị bằng hợp chất có công thức (I) dưới dạng liệu pháp điều trị thứ hai, liệu pháp điều trị thứ ba hoặc liệu pháp điều trị tiếp theo và liệu pháp này có thể hữu ích, đặc biệt khi khối u chứa gen đột biến ER α và do đó có thể kháng các liệu pháp hiện nay, như liệu pháp điều trị bằng thuốc. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng với liều lượng cao hơn để điều trị khối u kháng thuốc so với khối u thể đại).

Sáng chế mô tả phương pháp xác định độ nhạy cảm của tế bào với hợp chất có công thức (I). Phương pháp này bao gồm bước xác định tính trạng của gen ER α ở tế bào này. Tế bào được xác định là nhạy cảm với hợp chất có công thức (I) khi hợp chất này ức chế tăng số lượng tế bào trong thử nghiệm sinh trưởng tế bào (thông qua việc ức chế tăng sinh tế bào và/hoặc tăng cường gây chết tế bào). Phương pháp theo sáng chế là hữu ích để dự đoán tế bào có khả năng đáp ứng mạnh với hợp chất có công thức (I) bằng cách ức chế sinh trưởng.

Thuật ngữ “mẫu khối u phân tích” được dùng trong bản mô tả để chỉ mẫu khối u thực được phân lập, hoặc mẫu đã được xử lý thêm, ví dụ mẫu axit nucleic đã khuếch đại PCR từ mẫu khối u.

Thuật ngữ

Thuật ngữ “alen” được dùng trong bản mô tả để chỉ dạng cụ thể của locut gen, khác biệt so với các dạng còn lại của gen ở trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin cụ thể của nó.

Thuật ngữ “phản ứng khuếch đại” được dùng trong bản mô tả để chỉ phản ứng của axit nucleic tạo ra sự khuếch đại đặc trưng của axit nucleic đích so với axit nucleic không phải là đích. Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) là phản ứng khuếch đại đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “bệnh ung thư” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự phát triển khối u ác tính phát sinh từ quá trình biến đổi tế bào thành tế bào có kiểu hình ung thư. Quá trình biến đổi tế bào này thường liên quan đến đột biến gen.

Thuật ngữ “gen” được dùng trong bản mô tả để chỉ đoạn ADN chứa toàn bộ thông tin để sinh điều chế ARN, bao gồm vùng khởi đầu, đoạn exon, đoạn intron, và các đoạn trình tự khác mà có thể nằm ở đầu 5' hoặc 3' (không nằm trong đoạn phiên mã của gen) để kiểm soát biểu hiện.

Thuật ngữ “tính trạng của gen” được dùng trong bản mô tả để chỉ gen ở trạng thái thể dại hoặc không (tức là đột biến).

Thuật ngữ “hợp chất đánh dấu” được dùng trong bản mô tả để chỉ hợp chất có khả năng tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được thể hiện sự có mặt của polynucleotit đích trong mẫu phân tích, ví dụ về các hợp chất đánh dấu thích hợp bao gồm đồng vị phóng xạ, nucleotit mang màu, enzym, cơ chất, hợp chất phát huỳnh quang, gốc phát quang hóa học, hạt từ tính, gốc phát quang sinh học, và hợp chất tương tự. Hợp chất đánh dấu là hợp chất bất kỳ có thể phát hiện được bằng phương pháp quang phổ, quang hóa, sinh hóa, hóa học miễn dịch, điện học, quang học hoặc hóa học.

Thuật ngữ “biến thể không tương đồng” được dùng trong bản mô tả để chỉ biến thể ở hoặc trùng lặp với trình tự mã hóa của gen mà tạo ra trình tự polypeptit khác biệt (biến đổi). Các biến thể này có thể ảnh hưởng đến chức năng của protein hoặc không và bao gồm biến thể sai nghĩa (tạo ra đột biến thay thế một axit amin bằng một axit amin khác), biến thể vô nghĩa (tạo ra polypeptit bị đột biến mất đoạn do bộ ba mã hóa kết thúc chưa hoàn thiện được tạo ra) và biến thể chèn vào/loại bỏ.

Thuật ngữ “biến thể tương đồng” được dùng trong bản mô tả để chỉ biến thể ở trình tự mã hóa của gen mà không ảnh hưởng đến trình tự của polypeptit được mã hóa. Các biến thể này có thể ảnh hưởng gián tiếp đến chức năng của protein (ví dụ bằng cách biến đổi biểu hiện gen), nhưng khi không ảnh hưởng đến chức năng của protein, thì các biến thể này được xem là vô hại.

Thuật ngữ “axit nucleic” được dùng trong bản mô tả để chỉ phân tử ADN và ARN sợi đơn hoặc sợi kép bao gồm axit nucleic có trong tự nhiên và/hoặc axit nucleic nhân tạo, axit nucleic cải biến có khung hoặc bazơ nitơ cải biến như đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “đoạn môi” được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự ADN oligonucleotit sợi đơn đóng vai trò là điểm hoạt hóa điều chế sản phẩm kéo dài đoạn môi mà bổ sung với sợi axit nucleic cần sao chép. Chiều dài và trình tự của đoạn môi phải thích hợp để có thể hoạt hóa được quá trình điều chế sản phẩm kéo dài. Thông thường, chiều dài trình tự đoạn môi chứa ít nhất khoảng 7 nucleotit gần như bổ sung với trình tự đích, tốt hơn nếu các đoạn môi dài hơn được sử dụng. Thông thường, các đoạn môi chứa khoảng 15-26 nucleotit, tốt hơn nếu các đoạn môi dài hơn hoặc ngắn hơn cũng có thể được sử dụng.

Thuật ngữ “đoạn đa hình” được dùng trong bản mô tả để chỉ đoạn nằm trong locus gen ở đó ít nhất hai trình tự thay thế được phát hiện ở quần thể.

Thuật ngữ “dạng đa hình” được dùng trong bản mô tả để chỉ biến thể trình tự quan sát được ở cá thể ở đoạn đa hình. Dạng đa hình bao gồm đột biến thay thế nucleotit, đột biến chèn thêm nucleotit, đột biến loại bỏ nucleotit và vi thể kèm và có thể, nhưng không nhất thiết, tạo ra sự khác biệt có thể phát hiện được về biểu hiện gen hoặc chức năng của protein. Khi không có ảnh hưởng đến biểu hiện hoặc chức năng của protein, các dạng đa hình thông thường, bao gồm biến thể không tương đồng, thì thuật ngữ này được dùng để chỉ trình tự gen thể đại. Dữ liệu về dạng đa hình của người và thông tin liên quan, bao gồm hiệu lực, tần xuất quan sát được, và bệnh liên quan, được lưu giữ bởi NCBI (dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Lưu ý rằng thuật ngữ “dạng đa hình” khi sử dụng theo trình tự gen có nghĩa khác với thuật ngữ “dạng đa hình” khi sử dụng theo dạng rắn của hợp chất, tức là bản chất tinh thể hoặc vô định hình của hợp chất. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu ý nghĩa của thuật ngữ này.

Thuật ngữ “mẫu dò” được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự oligonucleotit sợi đơn đặc hiệu chứa trình tự bổ sung chính xác với trình tự đích của alen cần phát hiện.

Thuật ngữ “đáp ứng” được dùng trong bản mô tả để chỉ các phép đo được thực hiện theo tiêu chuẩn đánh giá đáp ứng của khối u rắn (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours - RECIST), bao gồm bước phân loại đối tượng bị bệnh thành hai nhóm chính: nhóm có đáp ứng một phần hoặc tình trạng bệnh ổn định và nhóm có dấu hiệu tiến triển bệnh.

Thuật ngữ “điều kiện lai hóa nghiêm ngặt” được dùng trong bản mô tả để chỉ quá trình ủ qua đêm ở nhiệt độ 42°C trong dung dịch chứa 50% formamit, SSC 5x (750mM NaCl, 75mM trisatrat), 50mM natri phosphat (độ pH = 7,6), dung dịch Denhardt 5x, 10% dextran sulphat, và 20pg/ml ADN tinh trùng cá hồi mất đoạn biến tính, sau đó rửa màng lọc bằng dung dịch SSC 0,1x ở nhiệt độ khoảng 65°C.

Thuật ngữ “sống sót” được dùng trong bản mô tả để chỉ khả năng sống sót toàn diện của đối tượng bị bệnh và khả năng sống sót mà không tiến triển bệnh.

Thuật ngữ “khả năng sống sót toàn diện” được dùng trong bản mô tả để chỉ khoảng thời gian từ khi bắt đầu dùng thuốc đến giai đoạn tử vong do nguyên nhân bất kỳ. Thuật ngữ “khả năng sống sót mà không tiến triển bệnh” được dùng trong bản mô tả để

chỉ khoảng thời gian từ khi bắt đầu dùng thuốc đến thời điểm lần đầu tiên xuất hiện tình trạng tiến triển bệnh hoặc giai đoạn tử vong do nguyên nhân bất kỳ.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), phương pháp này bao gồm tách tế bào khối u từ đối tượng bị bệnh; xác định xem gen ER α ở tế bào khối u của đối tượng bị bệnh là thể đại hay thể đột biến; và sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất có công thức (I).

Phương pháp này bao gồm hoặc không bao gồm bước phân lập mẫu từ đối tượng bị bệnh thực tế. Do đó, sáng chế cũng mô tả phương pháp sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), phương pháp này bao gồm xác định xem gen ER α ở tế bào khối u được phân lập trước từ đối tượng bị bệnh là thể đại hay thể đột biến; và sàng lọc đối tượng bị bệnh để điều trị bằng hợp chất có công thức (I).

Theo một phương án, đối tượng bị bệnh được sàng lọc để điều trị bằng hợp chất có công thức (I) khi ADN của tế bào khối u có đột biến gen ER α . Theo các phương án khác, đối tượng bị bệnh có ADN tế bào khối u có gen ER α thể đại được sàng lọc để điều trị bằng hợp chất có công thức (I).

Thuật ngữ “tính trạng gen thể đại” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự biểu hiện bình thường hoặc thích hợp của gen và chức năng bình thường của protein được mã hóa. Ngược lại, “tính trạng đột biến” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự biểu hiện của protein có chức năng bị biến đổi, phù hợp với vai trò đã biết của gen đột biến ER α ở bệnh ung thư (theo sáng chế), ví dụ về các biến đổi gen hoặc gen biểu sinh, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở đột biến, khuếch đại, loại bỏ, sắp xếp lại gen, hoặc biến đổi dạng methyl hóa, có thể tạo ra tính trạng đột biến. Tuy nhiên, khi các biến đổi này vẫn tạo ra sự biểu hiện thích hợp của protein bình thường, hoặc biến thể tương đương chức năng, thì tính trạng gen được xem là thể đại, ví dụ về biến thể thông thường mà không tạo ra tính trạng gen đột biến chức năng bao gồm biến thể mã hóa tương đồng và các dạng đa hình thông thường (tương đồng hoặc không tương đồng). Như được thể hiện dưới đây, tính trạng gen có thể được đánh giá bằng thử nghiệm chức năng, hoặc có thể được xác định từ các khác biệt phát hiện được với trình tự đối chiếu.

Theo một số phương án, tính trạng thể đại hoặc đột biến của gen ER α được xác định theo sự có mặt hoặc vắng mặt của biến thể axit nucleic không tương đồng ở gen.

Biến thể không tương đồng quan sát được tương ứng với các dạng đa hình thông thường đã biết không chức năng quan sát được không tạo ra tính trạng gen của đột biến.

Các tính trạng đột biến khác của gen $ER\alpha$ bao gồm biến thể trình tự ghép nối mà làm giảm nhận biết sự ghép nối đoạn intron và đoạn exon trong quá trình xử lý tiền ARN thông tin thành ARN thông tin. Điều này có thể dẫn đến loại bỏ đoạn exon hoặc liên hợp trình tự intron bình thường ở ARN thông tin ghép nối (giữ lại đoạn intron hoặc sử dụng đoạn ghép nối thể lặn). Nói cách khác, điều này có thể tạo ra đột biến chèn thêm và/hoặc loại bỏ protein so với protein bình thường. Do đó, theo các phương án khác, gen có tính trạng đột biến khi xuất hiện biến thể làm biến đổi trình tự nhận biết vị trí ghép nối đoạn intron và đoạn exon.

Đối với ESR1, các trình tự đối chiếu của gen này (Mã truy cập Ngân hàng gen: NG_008493), ARN thông tin (Mã truy cập Ngân hàng gen: NM_000125), và protein (Mã truy cập Ngân hàng gen: NP_000116 hoặc mã truy cập Swiss-Prot: P03372). Người có hiểu biết trình bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng xác định được tính trạng gen ESR1, tức là xác định xem gen ESR1 cụ thể là thể đại hay thể đột biến, bằng cách so sánh trình tự ADN hoặc trình tự với thể đại.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng gen và trình tự ARN thông tin của gen $ER\alpha$ là các trình tự đặc trưng. ở các cá thể bình thường có hai bản sao của mỗi gen, bản sao của cha và bản sao của mẹ, mà có thể sẽ có một số khác biệt về trình tự, hơn nữa trong một quần thể sẽ tồn tại nhiều biến thể alen của trình tự gen. Các trình tự khác được xem là thể đại bao gồm các trình tự có một hoặc nhiều các đột biến tương đồng đối với trình tự axit nucleic (mà không làm biến đổi trình tự protein được mã hóa), các dạng đa hình không tương đồng thông thường (ví dụ dạng đa hình dòng phôi) mà làm biến đổi trình tự protein nhưng không ảnh hưởng đến chức năng của protein, và các đột biến điểm không ghép nối ở đoạn intron.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng biết đến nhiều phương pháp để xác định tính trạng của gen $ER\alpha$. Tính trạng gen có thể được xác định bằng cách giải trình tự axit nucleic. Tính trạng gen có thể được xác định bằng cách giải trình tự trực tiếp gen có chiều dài đầy đủ hoặc phân tích vị trí đặc trưng trong gen, ví dụ vị trí đột biến thông thường.

Mẫu thử nghiệm

Mẫu bệnh phẩm để xác định tình trạng gen có thể là mô khối u bất kỳ hoặc tế bào khối u chứa mẫu thu được từ cá thể. Mẫu thử nghiệm thích hợp là mẫu máu, mẫu ở miệng, mẫu sinh thiết, dịch khác của cơ thể hoặc mô thu được từ cá thể, ví dụ cụ thể bao gồm: tế bào khối u tuần hoàn, ADN tuần hoàn trong huyết thanh hoặc huyết tương, tế bào được phân lập từ dịch cổ trướng của người bị bệnh ung thư buồng trứng, đờm phổi của người bị bệnh khối u phổi, dịch hút ra từ người bị bệnh ung thư vú, nước tiểu, máu ngoại vi, mảnh tế bào, nang lông, mảnh da hoặc mẫu khoang miệng

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng mẫu thử nghiệm đều có thể là trình tự axit nucleic tương ứng với trình tự trong mẫu thử nghiệm, tức là toàn bộ hoặc một vùng trong mẫu axit nucleic có thể được khuếch đại bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, ví dụ phản ứng chuỗi polymeaza (PCR), trước khi phân tích. Axit nucleic có thể là ADN bộ gen hoặc đoạn ADN hoặc ARN tổng số của tế bào. Theo các phương án cụ thể, ARN là ARN tổng số của tế bào và sử dụng trực tiếp làm khuôn để đánh dấu ADN bổ sung sợi đơn bằng cách sử dụng các đoạn môi hoặc nhiều đoạn môi ngẫu nhiên. Axit nucleic hoặc protein trong mẫu thử nghiệm có thể được tách chiết từ mẫu theo các phương pháp chuẩn (xem Green & Sambrook, Eds, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Phương pháp chẩn đoán theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu được tách chiết trước từ cá thể hoặc đối tượng bị bệnh. Các mẫu này có thể được bảo quản bằng cách đông khô hoặc cố định và ngâm trong formalin-parafin hoặc các môi trường khác. Theo cách khác, tế bào khối u tươi chứa mẫu có thể được thu nhận và sử dụng.

Phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào từ khối u bất kỳ. Các khối u thích hợp để điều trị bằng hợp chất có công thức (I) đã được mô tả theo sáng chế.

Phương pháp phát hiện axit nucleic

Đột biến của axit nucleic ER α có thể được phát hiện để sàng lọc dược chất. Do các đột biến trong các gen này xuất hiện ở mức độ ADN, phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách phát hiện các đột biến hoặc biến thể trong ADN bộ gen, cũng như các sản phẩm phiên mã và protein của chúng. Cần kiểm chứng các đột biến trong

ADN bộ gen bằng cách phân tích sản phẩm phiên mã và/hoặc polypeptit, để đảm bảo rằng các đột biến phát hiện được thực sự được biểu hiện ở đối tượng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có nhiều phương pháp phân tích có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của biến thể nucleotit ở một hoặc nhiều vị trí trong gen. Nhìn chung, phương pháp phát hiện biến thể alen cần có kỹ thuật phát hiện đột biến, tùy ý phản ứng khuếch đại (như phản ứng chuỗi polymeaza) và tùy ý hệ thống phát tín hiệu. Có rất nhiều kỹ thuật phát hiện đột biến đã biết trong lĩnh vực này và các kỹ thuật này có thể được sử dụng kết hợp với rất nhiều hệ thống phát tín hiệu đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp phát hiện biến thể alen được mô tả trong tài liệu: “Nollau et al, *Clin. Chem*, 1997, 43, 1114-1120; Anderson SM. *Expert Revmol Diagn*, 2011, 11, 635-642; Meyerson M. et al, *Nat Rev Genet*, 2010, 11, 685-696”; và các tài liệu chuẩn, ví dụ “*Laboratory Protocols for Mutation Detection*”, Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996 và “PCR”, 2nd Edition by Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

Như lưu ý nêu trên, sự có mặt hoặc vắng mặt của biến thể cụ thể hoặc nhiều biến thể ở gen ERα ở đối tượng bị bệnh ung thư có thể được xác định theo nhiều phương pháp. Các phương pháp này được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hoặc ARN thu được từ các mẫu sinh phẩm, ví dụ mô sinh thiết, nước tiểu, phân, đờm, máu, tế bào, mảnh mô, dịch chọc hút từ vú hoặc các vật liệu tế bào khác, và có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PCR, lai hóa với mẫu dò đặc hiệu alen, phát hiện đột biến bằng enzym, phân tách hóa học các bắt cặp sai lệch, khối phổ hoặc giải trình tự ADN, bao gồm giải trình tự các ADN có kích cỡ nhỏ.

Các kỹ thuật phát hiện đột biến thích hợp bao gồm hệ thống đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ARMSTM), hệ thống đột biến chịu nhiệt khuếch đại kéo dài tuyến tính (ALEXTM), hệ thống bắt cặp môi oligonucleotit cạnh tranh (COPS), Taqman, mẫu dò phân tử, phương pháp đa hình chiều dài các đoạn ADN cắt ngẫu nhiên (RFLP), và phương pháp phân tích vị trí giới hạn bằng PCR và phương pháp chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang.

Theo các phương án cụ thể, phương pháp này được sử dụng để xác định các nucleotit trong gen chỉ thị sinh học được chọn từ: phương pháp khuếch đại đặc hiệu alen (PCR đặc hiệu alen) - như hệ thống đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ARMS), giải trình tự,

thử nghiệm phân biệt alen, phương pháp lai hóa, phương pháp đa hình chiều dài các đoạn ADN cắt ngẫu nhiên (RFLP) hoặc thử nghiệm nối oligonucleotit (OLA).

Theo các phương án cụ thể, lai hóa với mẫu dò đặc hiệu alen có thể được thực hiện bằng cách: (1) oligonucleotit đặc hiệu alen được gắn kết với pha rắn (ví dụ màng thủy tinh, màng silicon, màng nylon) với mẫu được đánh dấu trong dung dịch, ví dụ trong nhiều ứng dụng chip ADN; hoặc (2) mẫu liên kết (thường là ADN tách dòng hoặc ADN đã khuếch đại PCR) và oligonucleotit được đánh dấu trong dung dịch (đặc hiệu alen hoặc mạch ngắn để cho phép giải trình tự bằng phương pháp lai hóa). Các phương pháp chẩn đoán có thể gồm bảng dữ liệu biến thể, thường gắn trên chất mang rắn, có thể xác định đồng thời nhiều hơn một biến thể. Các mẫu dò lai hóa này là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ xem Green & Sambrook, Eds, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) và có thể kéo dài qua hai hoặc nhiều vị trí biến thể.

Do đó, theo một phương án, phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của ít nhất một đột biến tạo ra sự tiếp xúc axit nucleic ER α chứa vị trí đột biến giả định với ít nhất một mẫu dò axit nucleic. Mẫu dò lai hóa đặc hiệu với trình tự axit nucleic bao gồm vị trí biến thể và chứa bazơ nucleotit bổ sung ở vị trí biến thể trong điều kiện lai hóa chọn lọc. Quá trình lai hóa có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các hợp chất đánh dấu đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ về các hợp chất đánh dấu này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở hợp chất đánh dấu phóng xạ, hợp chất đánh dấu huỳnh quang, chất màu, và enzym.

Theo một phương án khác, phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của ít nhất một đột biến tạo ra sự tiếp xúc axit nucleic ER α chứa vị trí đột biến giả định với ít nhất một đoạn mồi axit nucleic. Đoạn mồi lai hóa đặc hiệu với trình tự axit nucleic bao gồm vị trí biến thể và chứa bazơ nucleotit bổ sung ở vị trí biến thể trong điều kiện lai hóa chọn lọc.

Oligonucleotit được sử dụng làm các đoạn mồi để khuếch đại đặc hiệu có thể mang bazơ nucleotit bổ sung với đột biến quan tâm ở trung tâm của phân tử (do vậy quá trình khuếch đại phụ thuộc vào điều kiện lai hóa khác biệt; ví dụ xem Gibbs, et al, 1989. Nucl. Acids Res, 17, 2437-248) hoặc ở đầu tận cùng 3' của một đoạn mồi ở đó, trong các

điều kiện thích hợp, bắt cặp sai lệch có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm phản ứng kéo dài polymeaza (ví dụ xem Prossner, 1993, Tibtech, 11 238).

Theo một phương án khác, phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của ít nhất một đột biến bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trình tự axit nucleic và so sánh trình tự thu được với trình tự axit nucleic thể đại đã biết.

Theo cách khác, phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của ít nhất một đột biến bao gồm bước xác định bằng khối phổ ít nhất một trình tự axit nucleic.

Theo một phương án, phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của ít nhất một biến thể axit nucleic bao gồm bước thực hiện phản ứng chuỗi polymeaza (PCR). Trình tự axit nucleic đích chứa biến thể giả định được khuếch đại và trình tự nucleotit của axit nucleic đã khuếch đại được xác định. Việc xác định trình tự nucleotit của axit nucleic đã khuếch đại bao gồm bước giải trình tự ít nhất một đoạn axit nucleic. Theo cách khác, sản phẩm khuếch đại có thể được phân tích bằng phương pháp bất kỳ có khả năng phân tách sản phẩm khuếch đại theo kích cỡ của nó, bao gồm điện di trên gel tự động và bán tự động, và tương tự.

Các đột biến của axit nucleic bộ gen được phát hiện dễ dàng bởi các kỹ thuật dựa trên sự thay đổi về khả năng di động của mảnh axit nucleic đã khuếch đại., ví dụ Chen et al, *Anal Biochem* 1996, 239, 61-9, đề cập đến phương pháp phát hiện đột biến điểm bazơ nitơ bằng thử nghiệm thay đổi khả năng di động cạnh tranh. Hơn nữa, thử nghiệm dựa trên kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Marcelino et al, *BioTechniques* 1999, 26, 1134-1148 có bán trên thị trường.

Theo ví dụ cụ thể, phân tích đoạn lai xoắn kép mao quản có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của đột biến dựa trên sự thay đổi khả năng di động của axit nucleic xoắn kép trong hệ mao quản do sự có mặt của bắt cặp sai lệch.

Axit nucleic thể hệ sau để phân tích từ các mẫu nhìn chung cần khuếch đại axit nucleic. Nhiều phương pháp khuếch đại dựa trên phản ứng chuỗi enzym (như phản ứng chuỗi polymeaza, phản ứng chuỗi ligaza, hoặc tái bản trình tự tự kéo dài) hoặc bằng cách tái bản toàn bộ hoặc một phần vector trong đó axit nucleic đã được tách dòng. Tốt hơn nữa, quá trình khuếch đại theo sáng chế là quá trình khuếch đại theo cấp số nhân, khi được phát hiện bằng phản ứng chuỗi polymeraza.

Nhiều đích và phương pháp khuếch đại tín hiệu đã được mô tả trong các tài liệu, ví dụ Landegren, U. , et al, Science, 1988 242, 229-237 và Lewis, R, Genetic Engineering News 1990, 10, 54-55. Các phương pháp khuếch đại này có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, và bao gồm phản ứng chuỗi polymeaza (PCR), PCR tại chỗ, phản ứng khuếch đại ligaza (LAR), phản ứng lai hóa ligaza, replicaza thực khuẩn thể QB, hệ khuếch đại dựa trên quá trình phiên mã (TAS), phương pháp khuếch đại gen bằng cách giải trình tự sản phẩm phiên mã (GAWTS), phương pháp khuếch đại dựa trên trình tự axit nucleic (NASBA) và lai tại chỗ. Các đoạn mồi thích hợp để dùng trong các kỹ thuật khuếch đại có thể được thiết kế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) là phương pháp khuếch đại axit nucleic được mô tả trong Patent Mỹ số 4,683,195 và 4,683,202. PCR bao gồm các chu trình lặp lại của phản ứng kéo dài đoạn mồi được tạo ra bởi ADN polymeaza. ADN đích được biến tính nhiệt và hai oligonucleotit, đánh dấu trình tự đích trên hai sợi đối diện nhau của ADN cần khuếch đại, được lai hóa. Các oligonucleotit này trở thành các đoạn mồi để sử dụng với ADN polymeaza. ADN được sao chép bằng cách kéo dài đoạn mồi để tạo ra bản sao thứ hai của cả hai sợi. Bằng cách lặp lại chu trình biến tính nhiệt, lai hóa và kéo dài bằng đoạn mồi, ADN đích có thể được khuếch đại triệu lần hoặc cao hơn trong 2 đến 4 giờ. PCR là công cụ sinh học phân tử, cần được kết hợp với kỹ thuật phát hiện để xác định kết quả khuếch đại. Ưu điểm của PCR là phương pháp này làm tăng độ nhạy bằng cách khuếch đại lượng ADN đích 1 triệu đến 1 tỷ lần trong khoảng 4 giờ. PCR có thể được sử dụng để khuếch đại axit nucleic đã biết bất kỳ trong chẩn đoán bệnh (Mok et al, Gynaecologic Oncology, 1994, 52: 247-252.).

Kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen như hệ thống đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ARMS™) (Newton et al, Nucleic Acid Res, 1989, 17, 2503-2516) cũng có thể được sử dụng để phát hiện đột biến điểm bazơ nitơ. Trong các điều kiện khuếch đại PCR thích hợp, bắt cặp sai lệch một bazơ nitơ nằm ở đầu 3' của đoạn mồi là đủ để khuếch đại đặc hiệu alen bắt cặp đúng (Newton et al, 1989), cho phép phát hiện các loài tương đồng gần. Nguyên lý của hệ khuếch đại sử dụng các đoạn mồi nêu trên là các oligonucleotit có đầu 2' bắt cặp sai lệch sẽ không đóng vai trò làm các đoạn mồi trong PCR trong các điều kiện thích hợp. Hệ khuếch đại này cho phép chỉ tạo ra kiểu gen bằng cách kiểm tra hỗn hợp phản ứng sau khi điện di trên gel agarose.

Sản phẩm khuếch đại có thể được phân tích bằng phương pháp bất kỳ có khả năng phân tách sản phẩm khuếch đại theo kích cỡ của nó, bao gồm điện di trên gel tự động và bán tự động, khối phổ, và tương tự.

Phương pháp phân lập, khuếch đại và phân tích axit nucleic là đã biết trong lĩnh vực này và ví dụ về các phương pháp này được mô tả trong các tài liệu Green & Sambrook, Eds, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*), ví dụ về các phương pháp đặc biệt hữu ích để sử dụng trong khuếch đại PCR là PCR (*Basics: From Background to Bench*) by M. J. McPherson, S. G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, *Springer Verlag; 1st edition (October 15, 2000), ISBN: 0387916008*.

Sáng chế cũng đề xuất kit chẩn đoán, bao gồm các đoạn môi thoát biến để khuếch đại axit nucleic đích trong gen ER α và tờ hướng dẫn quy trình khuếch đại và phân tích kết quả. Theo cách khác, kit này cũng bao gồm dung dịch đệm, enzym, và đồ chứa để thực hiện quá trình khuếch đại và phân tích sản phẩm khuếch đại. Kit này cũng có thể là công cụ sàng lọc, hoặc kit chẩn đoán này còn bao gồm các công cụ khác như chip ADN, hoặc các công cụ hỗ trợ khác. Tốt hơn nếu, kit này cũng bao gồm một hoặc nhiều khuôn đối chứng, như axit nucleic được phân lập từ mẫu mô bình thường, và/hoặc một loạt các mẫu chứa các biến thể khác nhau trong các gen đối chiếu.

Theo một phương án, kit theo sáng chế bao gồm hai hoặc nhiều cặp đoạn môi, mỗi cặp có khả năng khuếch đại vùng khác nhau của gen ER α đối chiếu (mỗi vùng tương ứng là một vị trí biến thể tiềm năng), nhờ đó thu được kit có thể phân tích biểu hiện nhiều biến thể gen trong mẫu sinh phẩm trong một phản ứng hoặc nhiều phản ứng song song.

Các đoạn môi trong kit có thể được đánh dấu, ví dụ đánh dấu huỳnh quang, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện sản phẩm khuếch đại và phân tích các biến thể axit nucleic. Kit này cũng cho phép có thể phát hiện nhiều hơn một biến thể trong một phân tích. Do đó, kit này sẽ bao gồm các đoạn môi có khả năng khuếch đại các mảnh khác nhau của gen đối chiếu. Các đoạn môi có thể được đánh dấu khác biệt, ví dụ bằng cách sử dụng hợp chất đánh dấu huỳnh quang, để phân biệt giữa các biến thể này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư, bao gồm bước xác định trạng thái đột biến hoặc thể đại của gen ER α ở đối tượng có tế bào

khối u và khi gen ER α bị đột biến, cho đối tượng bị bệnh sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I).

Thuật ngữ “hữu hiệu” và “hữu dụng” được dùng trong bản mô tả để chỉ cả đặc tính an toàn hữu dụng về mặt dược học lẫn sinh lý học. Đặc tính an toàn hữu dụng về mặt dược học là khả năng điều trị để tạo ra tác dụng sinh học mong muốn ở đối tượng bị bệnh. Đặc tính an toàn hữu dụng về mặt sinh lý học là mức độ độc tính, hoặc các tác dụng sinh lý không mong muốn khác ở tế bào, cơ quan và/hoặc bề mặt cơ quan (thường được gọi là tác dụng phụ) được tạo ra khi điều trị. Thuật “không hữu hiệu” được dùng trong bản mô tả để chỉ kết quả điều trị về mức độ an toàn hữu dụng về mặt dược học thấp hơn đáng kể và/hoặc mức độ tác dụng sinh lý không mong muốn cao hơn đáng kể tác dụng điều trị.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó để điều trị bệnh ung thư tế bào khối u đã được xác định là có đột biến gen ER α . Theo một phương án hợp chất có công thức (I) là hợp chất theo ví dụ 1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó để điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u được xác định là có đột biến gen ER α . Theo một phương án hợp chất có công thức (I) là hợp chất theo ví dụ 1.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u được xác định là có đột biến gen ER α , bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó. Theo một phương án hợp chất có công thức (I) là hợp chất theo ví dụ 1.

Theo khác phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) để dùng trong phòng ngừa và điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u được xác định là có đột biến gen ER α . Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là hợp chất theo ví dụ 1.

Trong toàn bộ các khía cạnh nêu trên, dạng đột biến của ER α được xác định ở toàn bộ các vị trí của gen này.

Trong toàn bộ các khía cạnh nêu trên, khi sử dụng khối u ung thư vú, thì dạng đột biến cụ thể của ER α được xác định ở các vị trí Ser463Pro, Val543Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn và Asp538Gly.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây, trong đó:

(i) các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ môi trường, tức là nằm trong khoảng từ 17°C đến 25°C và trong điều kiện khí trơ như nitơ trừ khi có quy định khác;

(ii) công đoạn bay hơi được thực hiện bằng máy bay hơi quay; thiết bị Genevac hoặc máy bay hơi Biotage v10 trong điều kiện chân không và các quy trình này được thực hiện sau khi loại bỏ cặn rắn bằng cách lọc;

(iii) công đoạn tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh được thực hiện trên thiết bị tự động Teledyne Isco CombiFlash® Rf hoặc Teledyne Isco CombiFlash® Companion® sử dụng cột silica RediSep Rf Gold™ đã nhồi sẵn (hạt silica hình cầu có kích cỡ nằm trong khoảng từ 20 µm đến 40µm), cột GraceResolv™ (Davisil® silica) hoặc cột Silicycle (40 - 63 µm).

(iv) công đoạn sắc ký điều chế được thực hiện trên thiết bị Gilson prep HPLC phát hiện bằng tia UV;

(v) công đoạn sắc ký điều chế phân tách đồng phân quang học được thực hiện trên thiết bị Gilson phát hiện bằng tia UV (bộ thu phân đoạn/tiêm mẫu 233, bơm 333 & 334, detector 155 UV) hoặc thiết bị Varian Prep Star (bơm 2 x SD1, detector 325 UV, bộ thu phân đoạn 701), bơm chạy bằng bộ tiêm mẫu Gilson 305;

(vi) hiệu suất, khi được tính toán, không nhất thiết là hiệu suất tối đa;

(vii) công thức cấu tạo của hợp chất có công thức I được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR); hệ số dịch chuyển hóa học NMR được đo theo thang delta [phổ cộng hưởng từ proton được xác định bằng thiết bị Bruker Avance 500 (500 MHz) or Bruker Avance 400 (400 MHz)]; các phép đo được thực hiện ở nhiệt độ môi trường, trừ khi có quy định khác; các ký hiệu viết tắt sau được sử dụng: s: một vạch; d: hai vạch; t: ba vạch; q: bốn vạch; m: nhiều vạch; dd: hai vạch đôi; ddd: bốn vạch đôi; dt: hai vạch ba; bs: vạch rộng.

(viii) công thức cấu tạo của hợp chất có công thức I cũng được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LCMS hoặc UPLC); UPLC được thực hiện bằng hệ thống Waters UPLC được trang bị máy khối phổ Waters SQ (nhiệt độ cột: 40°C, UV = 220-300nm, Khối phổ = ESI với kiểu dương/âm) ở tốc độ dòng bằng 1mL/phút sử

dụng hệ dung môi chứa 97% A + 3% B đến 3% A đến 97% B trong 1,50 phút (tổng thời gian chạy mẫu cộng với thời gian hiệu chỉnh điều kiện ban đầu khoảng 1,70 phút, trong đó A = dung dịch nước chứa 0,1% axit formic (để phân tích axit) hoặc dung dịch nước chứa 0,1% amoniac (để phân tích bazơ); B = axetonitril. Để phân tích axit, cột được sử dụng là Waters Acquity HSS T3 1,8 μ m 2,1 x 50 mm, để phân tích bazơ, cột được sử dụng là Waters Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x 50mm; LCMS được thực hiện bằng hệ thống Waters Alliance HT (2795) được trang bị máy khối phổ Waters ZQ ESCi và cột Phenomenex Gemini -NX (50 x 2,1mm x 5 μ m) ở tốc độ dòng bằng 1,1mL/phút 95% A đến 95% B trong 4 phút với thời gian giữ mẫu bằng 0,5 phút. Pha động được duy trì không đổi ở 5% C (50:50 axetonitril:nước 0,1% axit formic) hoặc D (50:50 axetonitril:nước 0,1% amoni hydroxit (0,88 SG) phụ thuộc vào phương pháp có tính axit hoặc bazơ.

(ix) công đoạn tinh chế trao đổi được thực hiện bằng cột SCX-2 (Biotage, silica liên hợp axit propylsulfonic được sản xuất bằng silan ba chức không chứa đầu được chụp mũ).

(x) độ tinh khiết của các hợp chất trung gian được đánh giá bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, khối phổ, HPLC (sắc ký lỏng hiệu năng cao) và/hoặc NMR;

(xi) để phân tích mẫu nhiễu xạ bột tia X của hợp chất theo ví dụ 7, các mẫu được đặt vào miếng bán dẫn silic đã hiệu chỉnh về 0 và phân tích bằng nhiễu xạ kế PANalytical CubiX Pro ($1 = 1,5418\text{\AA}$). Các mẫu được quay để cải thiện dữ liệu thống kê. Dữ liệu được thu theo góc nhiễu xạ 2 theta nằm trong khoảng từ 2° đến 40° 2-theta với thời gian tiếp xúc bằng 25 giây tính trên độ tăng góc nhiễu xạ bằng 0,025067°. Tia X được tạo ra bằng ống đồng dài có độ hội tụ cao được vận hành ở điện thế 45kV và dòng điện 40mA. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng cường độ tương đối của các đỉnh có thể bị ảnh hưởng bởi, ví dụ các hạt có kích cỡ trên 30 μ m và tỷ lệ hình dạng hạt không đồng nhất có thể ảnh hưởng đến kết quả phân tích mẫu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng vị trí phản xạ có thể bị ảnh hưởng bởi chiều cao chính xác của mẫu nằm trong nhiễu xạ kế và kết quả hiệu chỉnh về 0 của nhiễu xạ kế. Độ phẳng của bề mặt mẫu có thể cũng ảnh hưởng ít đến vị trí phản xạ. Do đó, dữ liệu mẫu nhiễu xạ không phải là trị số tuyệt đối;

(xii) để phân tích mẫu nhiều xạ bột tia X của hợp chất theo ví dụ 1, mẫu hợp chất tinh thể được đặt vào miếng bán dẫn đơn tinh thể silic do Panalytical sản xuất và dàn mẫu thành lớp mỏng bằng phiến kính hiển vi. Mẫu được quay ở tốc độ 30 vòng/phút (để cải thiện dữ liệu thống kê) và chiếu tia X được tạo ra bằng ống đồng dài có độ hội tụ cao được vận hành ở 45kV và 40mA ở bước sóng bằng 1,5418Å. Tia X được chiếu vào khe đáy 0,04rad, sau đó chiếu vào khe phân kỳ tự động có chiều dài 20mm và cuối cùng là chiếu vào màn chắn tia có chiều dài 20mm. Tia phản xạ được thu trực tiếp vào khe chống phản xạ có chiều dài 20mm và khe đáy 0,04rad. Mẫu được tiếp xúc trong 1,905 giây tính trên độ tăng góc nhiễu xạ bằng 0,0025067° 2-theta (kiểu quét liên tục) nằm trong khoảng từ 2° đến 40°. Thời gian chạy mẫu là 3 phút và 36 giây. Thiết bị này được trang bị detector X-Celerator. Dữ liệu được kiểm soát và thu nhận bằng thiết bị Dell Pentium 4HT được trang bị phần mềm X'Pert.

(xiii) thiết bị đo nhiệt lượng quét vi sai: thiết bị TA Q1000 DSC. Thông thường, khoảng 5mg hợp chất chứa trong đĩa nhôm chuẩn được trang bị nắp được gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25Error! Reference source not found.C đến 300Error! Reference source not found.C ở tốc độ gia nhiệt không đổi bằng 10Error! Reference source not found.C/phút. Hệ thống được sục khí nitơ - tốc độ dòng 50mL/phút.

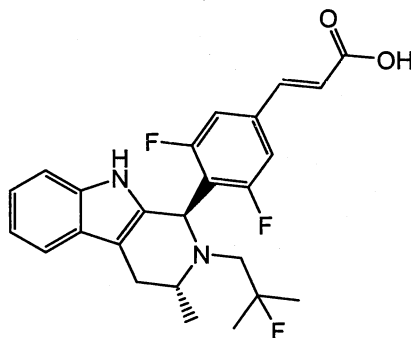
(xiv) thiết bị phân tích nhiệt trọng: thiết bị TA Q5000 TGA. Thông thường, khoảng 10mg hợp chất được đặt vào đĩa platin có dung tích 100µL và gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30Error! Reference source not found.C đến 150Error! Reference source not found.C ở tốc độ gia nhiệt không đổi bằng 10Error! Reference source not found.C/phút.

(xv) các ký hiệu viết tắt sau được sử dụng:

aq.	nước
CDCl ₃	đeteri-cloform
Conc.	cô
DCM	điclometan
DMA	<i>N,N</i> -đimetylaxetamit
DMSO	đimetyl sulphoxit
DSC	đo nhiệt lượng quét vi sai
EtOH	etanol
EtO	axetyl axetat
IPA/iPrOH	rượu isopropylic
MeCN	axetonitril
MTBE	metyltertbutyl ete
rt/RT	nhiệt độ phòng
sat.	bão hòa

sol	dung dịch
THF	tetrahydrofuran
TFA	axit trifloaxetic
TGA	phân tích nhiệt trọng

Ví dụ 1: axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic



Các quy trình sau cần được thực hiện trong điều kiện khí nitơ và tránh ánh sáng do sản phẩm phân hủy [(R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat] có thể được tạo ra.

(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (350g, 766,69mmol) được nạp vào bình kín dung tích 5L. Rượu isopropylic (2,80L) được bổ sung vào bình này. Natri hydroxit (5M, 460mL, 2,30mol) được bổ sung một phần vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 21°C trong 16 giờ. Dung dịch sẫm màu được lọc qua màng lọc để loại bỏ các chất kết tủa. Dịch lọc được nạp trở lại vào bình phản ứng. Bình thu dịch lọc và màng lọc được rửa bằng isopropanol (700mL) và dịch rửa được bổ sung vào bình phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy và nước (1,75L) được bổ sung vào. Axit hydrocloric đặc (37% khối lượng/khối lượng, 165mL, 1,92mol) được nạp vào bình phản ứng. Axit hydrocloric (21,5mL) được bổ sung thêm vào bình này để điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 4,0 đến 4,5. Dung dịch này được gia nhiệt đến nhiệt độ 50°C. Nước (1,92L) được bổ sung vào bình phản ứng trong 1 giờ duy trì nhiệt độ khối phản ứng bên trong nằm trong khoảng từ 50°C đến 53°C. Nhiệt độ vỏ bình được nâng đến 70°C để duy trì nhiệt độ bình phản ứng nằm trong khoảng này trong khi bổ sung. Trong vòng 10 phút bổ sung hoàn toàn nước, hỗn hợp này được tự tạo mầm và bắt đầu kết tinh. Hỗn hợp này được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng 50°C đến 52°C trong 1,5 giờ (nhiệt độ vỏ bình bằng 58°C). Hỗn dịch màu vàng thu được được làm lạnh đến nhiệt độ 5°C (nhiệt độ vỏ bình) trong 6 giờ. Hỗn dịch đặc này được giữ ở nhiệt độ 5°C (nhiệt độ vỏ bình) trong 11

giờ. Lọc thu lấy chất rắn màu vàng thu được. Bánh lọc được nén bằng thìa để ngăn ngừa vỡ bánh lọc. Bình phản ứng được rửa bằng nước (1,05L). Dịch rửa được sử dụng để rửa bánh lọc. Bánh lọc được hút khô trong không khí, sau đó làm khô trong điều kiện chân không đến khối lượng không đổi trong 4 ngày (nhiệt độ lò = 30°C) để thu được axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic dưới dạng tinh thể rắn, “Dạng B” (319,45g, 94%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,05 (3H, d), 1,08 - 1,28 (6H, m), 2,35 (1H, dd), 2,58 (1H, dd), 2,8 - 2,97 (2H, m), 3,47 - 3,57 (1H, m), 5,22 (1H, s), 6,67 (1H, d), 6,91 - 7,06 (2H, m), 7,19 (1H, d), 7,41 (1H, d), 7,46 (2H, d), 7,54 (1H, d), 10,58 (1H, s), 12,62 (1H, s).

Phương pháp khác để điều chế hợp chất theo ví dụ 1 ở dạng tinh thể B như sau:

Các quy trình sau cần được thực hiện trong điều kiện khí nitơ và tránh ánh sáng do sản phẩm phân hủy (như nêu trên) có thể được tạo ra.

(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (50,0g; 109,53mmol) được khuấy trong rượu isopropylic (450mL). Natri hydroxit (68,34g, 65,72mL, 328,58mmol) được bổ sung một phần vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng với nước (250mL), độ pH được điều chỉnh đến pH = 4 bằng axit hydrocloric đặc (27,28ml, 317,63mmol) và hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 50°C. Nước (225mL) được bổ sung thêm vào trong 30 phút, duy trì nhiệt độ cao hơn 45°C. Trong quá trình bổ sung, hợp chất bắt đầu kết tinh. Hỗn hợp này được làm lạnh từ 50°C đến 5°C trong 5 giờ, sau đó hỗn dịch này được giữ ở nhiệt độ 0°C trong 11 giờ nữa. Lọc thu lấy chất rắn màu vàng. Bánh lọc được rửa bằng nước (100mL), làm khô trên màng lọc thêm 20 phút, sau đó làm khô trong lò chân không trong 16 giờ đến khối lượng không đổi (30°C, hút không khí) để thu được hợp chất mong muốn (46,52g) dưới dạng tinh thể rắn (Dạng B).

¹H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,02 - 1,09 (3H, m), 1,17 (6H, dd), 2,37 (1H, dd), 2,59 (1H, dd), 2,8 - 2,98 (2H, m), 3,47 - 3,58 (1H, m), 5,24 (1H, s), 6,68 (1H, d), 6,9 - 7,06 (2H, m), 7,20 (1H, d), 7,38 - 7,51 (3H, m), 7,55 (1H, d), 10,59 (1H, s), 12,60 (1H, br).

Dạng tinh thể B có thể được phân lập từ hỗn hợp etanol/nước và hỗn hợp etanol/MTBE.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất dạng tinh thể B theo ví dụ 1, được phân lập từ hỗn hợp isopropanol/nước.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình phân lập dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1, bao gồm bước thủy phân (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat trong rượu isopropylic và bazơ, sau đó axit hóa và phân lập dạng tinh thể từ dung dịch nước isopropanol.

Dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1 có ít nhất một trong số các đỉnh ở các góc 2θ đo được bằng bức xạ $\text{CuK}\alpha$ là $8,4^\circ$ và $10,9^\circ$. Dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1 có mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.2. Mười cực đại nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trong Bảng A.

Bảng A

Mười cực đại nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1

Góc 2-theta (2θ)	Cường độ%
8,4	100
10,9	88,5
18,3	84,5
24,0	78,5
14,0	66,4
19,0	55,9
14,4	54,3
13,0	45
15,3	44,7
20,6	44,2

Đo nhiệt lượng quét vi sai của dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1 cho thấy dạng tinh thể này có nhiệt độ nóng chảy cao và bắt đầu nóng chảy kết hợp thu nhiệt ở nhiệt độ $188,6^\circ\text{C}$ (Fig.3). Hợp chất theo ví dụ 1 bị phân hủy trong quá trình nóng chảy dẫn đến sai lệch về nhiệt độ nóng chảy, do đó trị số $188,6^\circ\text{C}$ không phải là trị số chính xác tuyệt đối.

Hai dạng solvat của hợp chất theo ví dụ 1 cũng được quan sát thấy.

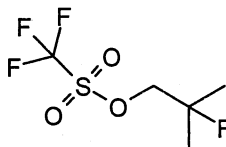
Dạng A là metyl tertiary butyl ete mono-solvat. Mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.4. TGA thể hiện khối lượng mất là 14,7% khối lượng/khối lượng ở nhiệt độ

nằm trong khoảng từ 55°C đến 150°C (Fig.5). Khối lượng mất lý thuyết của mono methyl tertiary butyl ete solvat đo được là 16,6%.

Dạng C là axeton mono-solvat, mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Fig.6. TGA thể hiện khối lượng mất là 10,0% khối lượng/khối lượng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55°C đến. (Fig.7). Khối lượng mất lý thuyết của mono-axeton solvat đo được là 11,0%.

(E)-methyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

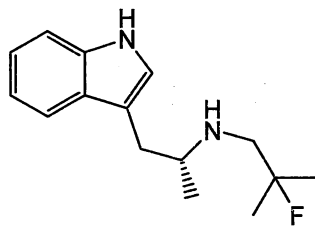
Quy trình điều chế 2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat



Trong điều kiện khí nitơ, 2-flo-2-metyl-propan-1-ol (1000g, 10,86mol) được nạp vào bình phản ứng dung tích 20L. DCM (8,5L) được bổ sung vào bình này. Hỗn hợp này được khuấy và làm lạnh đến nhiệt độ 1°C. 2,6-Lutidin (1395g, 13,02mol) được bổ sung vào hỗn hợp này. Dung dịch chứa triflometansulfonic anhydrit (3220g; 11,41mol) trong DCM (1L) được bổ sung vào trong 1 giờ duy trì nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng nhỏ hơn 5°C (nhiệt độ vỏ bình được hạ xuống đến -20°C trong quá trình bổ sung). Bình bổ sung và đường ống bổ sung được rửa bằng DCM (0,5L) và dịch rửa được bổ sung vào bình phản ứng trong một phần. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ để thu được dung dịch màu đỏ.

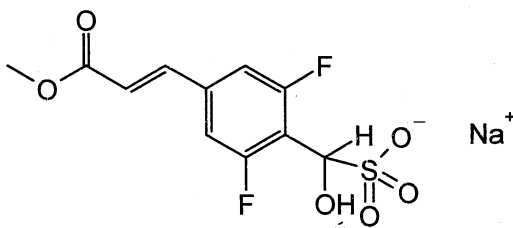
Dung dịch chứa axit hydrocloric đặc (1,23L; 37% khối lượng/khối lượng, 16,3mol) được bổ sung vào nước (7L). Dung dịch axit hydrocloric loãng được bổ sung vào dung dịch màu đỏ và dung dịch đã được khuấy được làm ấm đến nhiệt độ 25°C. Các lớp được để phân tách và lớp nước phía trên được loại bỏ. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước (2 x 5L). Dung dịch hữu cơ được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được dầu màu đỏ. Dầu màu đỏ được tinh chế bằng cách chưng cất bằng thiết bị bay hơi kiểu màng mỏng (4,5 mbar, nhiệt độ vỏ bình 50°C, nhiệt độ bộ phận ngưng tụ 4°C) để thu được 2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (1,69kg, 69%) dưới dạng dầu màu đỏ nhạt. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 27°C) δ 1,40 (6H, d), 4,79 (2H, d).

Quy trình điều chế (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-fluoro-2-methylpropan-1-amin



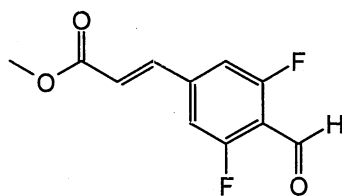
(2R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amin (3,81kg, 21,21mol) được bổ sung vào bình tráng thủy tinh dung tích 100L có vỏ bảo vệ trong điều kiện khí nitơ. 1,4-dioxan (23L) được bổ sung vào, và máy khuấy được bật. Diisopropyletylamin (5,55L; 31,82mol) được bổ sung vào hỗn dịch đã được khuấy, sau đó (2-fluoro-2-methyl-propyl)triflometansulfonat (5,55kg, 23,77mol). 1,4-dioxan (4L) được bổ sung vào bình này, và hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 75°C. Quá trình gia nhiệt được tiếp tục trong 24 giờ trước khi làm nguội hỗn hợp này đến nhiệt độ 25°C. Nước (30,5L) được bổ sung vào bình này, sau đó bổ sung toluen vào (30,5L). Sau 40 phút máy khuấy được tắt và các lớp được để phân tách. Lớp nước được loại bỏ và nước (30,5L) được bổ sung vào dung dịch hữu cơ. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút trước khi phân tách các lớp. Lớp hữu cơ được tách ra khỏi bình phản ứng. Dung dịch hữu cơ được cô bằng cách cất chân không (nhiệt độ vỏ bình 65°C, áp suất 110mbar) cho đến khi 27L dịch cất đã được tách ra. Dung dịch còn lại trong bình phản ứng được làm nguội để thu được (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-fluoro-2-methylpropan-1-amin dưới dạng dung dịch trong toluen (33% khối lượng/khối lượng) (15,4kg, 97%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,98 (3H, d), 1,26 (3H, d), 1,30 (3H, d), 2,57 - 2,75 (3H, m), 2,81 (1H, dd), 2,84 - 2,92 (1H, m), 6,97 (1H, t), 7,06 (1H, t), 7,11 - 7,22 (1H, nhiều vạch bị che khuất bởi các tín hiệu toluen), 7,34 (1H, d), 7,52 (1H, d), 10,80 (1H, s).

Quy trình điều chế natri {2,6-đifluo-4-[(1E)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-yl]phenyl}(hydroxy)metansulfonat



2,6-điflo-4-brombenzaldehyt (1000g, 4,39mol) và 1,1-bis(di-tert-butylphosphino)ferocen paladi điclorua (57,2g; 87,76mmol) được nạp vào bình phản ứng dung tích 20L. Tetra-n-butylamoni clorua (122g, 438,97mmol) được bổ sung vào, sau đó bổ sung dimetylaxetamit vào (5L). Bình phản ứng được sục dòng khí nitơ. Diisopropyletylamin (1,5L; 8,78mol) được bổ sung vào bình này, sau đó bổ sung methyl acrylat vào (0,435L; 4,82mol). Hỗn hợp này được khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C. Hỗn hợp này được giữ ở nhiệt độ này trong 20 giờ. Etyl axetat (10L) được bổ sung vào hỗn hợp này và dừng gia nhiệt. Nước (5L) được bổ sung vào bình này. Hỗn hợp đã được khuấy được làm nguội đến nhiệt độ 25°C và tiếp tục khuấy trong 10 phút. Dừng khuấy và các lớp được để phân tách. Lớp nước được hút và loại bỏ. Lớp hữu cơ được rửa lần lượt bằng axit hydrocloric (2,2M, 6L) và nước (5L). Chất hấp thụ phosphonic SPM32 (1050g, 1050mol) được bổ sung vào bình này và hỗn hợp này được khuấy trong 3 ngày ở nhiệt độ 25°C. Lọc phân tách chất rắn. Bánh lọc được rửa bằng etanol (5L) và dịch lọc thu gom được được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn. Chất rắn này được hòa tan trong etanol (9L) và dung dịch được khuấy in bình phản ứng dung tích 20L. Dung dịch này được gia nhiệt đến nhiệt độ 50°C. Dung dịch chứa natri bisulfit (460g, 4,42mol) trong nước (2,5L) được bổ sung vào trong 30 phút. Hỗn dịch đặc thu được được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ 50°C. Hỗn dịch đặc này được làm nguội đến nhiệt độ 20°C trong 2 giờ. Lọc phân tách chất rắn và bình phản ứng và bánh lọc được rửa bằng MTBE (2 x 3L). Chất rắn thu được được làm khô trong điều kiện chân không để thu được natri {2,6-điflo-4-[(1E)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-yl]phenyl}(hydroxy)metansulfonat (1035g, 71%) dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt. ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) δ 3,73 (3H, s), 5,32 (1H, d), 5,94 (1H, d), 6,76 (1H, d), 7,40 (2H, d), 7,60 (1H, d).

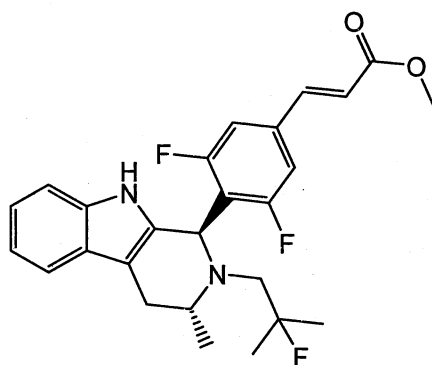
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat



Trong điều kiện khí nitơ, natri {2,6-điflo-4-[(1E)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-yl]phenyl}(hydroxy)metansulfonat (1,211kg, 3,52mol) được bổ sung vào bình phản ứng dung tích 100L, sau đó bổ sung kali carbonat vào (0,974kg, 7,05mol). Nước (9,1L) được bổ sung vào và máy khuấy được bật. Etyl axetat (9,1L) được bổ sung vào. Hỗn hợp này

được khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 5 giờ. Máy khuấy được tắt và hỗn hợp này được để yên trong 14 giờ ở nhiệt độ 25°C. Pha nước bên dưới được hút và loại bỏ. Pha hữu cơ bên trên được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn màu nâu nhạt. Chất rắn này được làm khô trong điều kiện chân không để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat dưới dạng chất rắn màu nâu (608g, 76%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) δ 3,77 (3H, s), 6,94 (1H, d), 7,66 (1H, d), 7,71 (2H, d), 10,20 (1H, s).

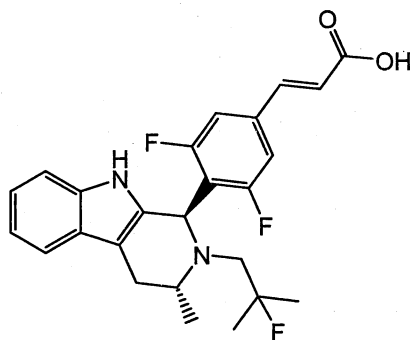
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



Trong điều kiện khí nitơ, (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat (0,606kg, 2,65mol) và (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin (33% khối lượng/khối lượng solution trong toluen, 2,0kg, 2,65mol) được nạp vào bình phản ứng dung tích 20L, sau đó bổ sung toluen vào (4,22L). Axit axetic (304mL, 5,31mol) được bổ sung vào bình này. Hỗn hợp này được khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 80°C qua đêm trước khi làm nguội đến nhiệt độ 20°C. Dung dịch chứa kali carbonat (0,916kg, 6,63mol) trong nước (3,3L) được bổ sung vào hỗn hợp này. Hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút trước khi máy khuấy được tắt và các lớp được để phân tách. Lớp nước được hút và loại bỏ. Nước (3,3L) được nạp vào bình phản ứng. Hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút, sau đó để yên trong 10 phút. Pha nước bên dưới được loại bỏ và lớp hữu cơ được để yên ở nhiệt độ phòng qua đêm. Lô này được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C. Heptan (4,61L) được bổ sung vào dung dịch nóng trong 35 phút. Hỗn hợp đã được khuấy được giữ ở nhiệt độ khoảng 80°C trong 1 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ 30°C trong 2 giờ trong thời gian này xuất hiện tinh thể hợp chất. Hỗn dịch đặc này được khuấy ở nhiệt độ 30°C trong 2,5 giờ. Lọc phân tách chất rắn. Thành bình phản ứng được rửa bằng heptan và dịch rửa được sử dụng để rửa bánh lọc. Chất rắn này được làm khô trong điều kiện chân không để thu được (E)-metyl

3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat dưới dạng chất rắn màu hồng (0,763kg, 61%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) δ 1,06 (3H, d), 1,13 (3H, d), 1,21 (3H, d), 2,35 (1H, dd), 2,58 (1H, dd), 2,8 - 2,98 (2H, m), 3,44 - 3,61 (1H, m), 3,74 (3H, s), 5,24 (1H, s), 6,80 (1H, d), 6,9 - 7,05 (2H, m), 7,19 (1H, d), 7,41 (1H, d), 7,50 (2H, d), 7,63 (1H, d), 10,58 (1H, s). m/z: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 457.

Quy trình khác để điều chế hợp chất theo ví dụ 1: axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic

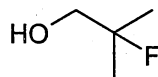


Natri hydroxit 7,5M (32,9mL, 247,10mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (11,28g, 24,71mmol) trong THF (143mL) và metanol (71,4mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Dung dịch nước này được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng 6,5 bằng dung dịch axit HCl 2N, sau đó dung dịch này được chiết bằng dietyl ete (3 x 150mL). Lớp hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na_2SO_4 và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 20% metanol trong DCM để thu được chất rắn màu vàng. Không thể nghiền được chất rắn này với axeton/heptan do độ hòa tan cao hơn dự kiến. Dung môi được loại bỏ để thu được chất rắn màu vàng được nghiền trong isohexan (50mL) và vài giọt dietyl ete, chất rắn thu được được lọc ra và làm khô để thu được hợp chất thô (11,14g) dưới dạng bột màu vàng. Chất rắn này được hòa tan trong etanol (100mL), trong điều kiện khí nitơ và trong bóng tối. Sau đó, dung dịch này được làm bay hơi đến 5mBar bằng bơm chân không ở nhiệt độ 62°C trong bóng tối. Quy trình này được lặp lại hai lần và chất rắn màu vàng dạng thủy tinh thu được được cạo bằng thìa thành bột mịn và đưa vào áp suất 5mBar bằng bơm chân không ở nhiệt độ

62°C trong 60 phút, để thu được bột màu vàng. Sau đó, bột này được để trong lò chân không trên P₂O₅ ở nhiệt độ 62°C ở áp suất 300mBar qua đêm để thu được hợp chất mong muốn (9,77g, 89%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) δ 1,07 - 1,16 (3H, m), 1,18 - 1,29 (6H, m), 2,39 (1H, dd), 2,62 (1H, dd), 2,92 (2H, dd), 3,56 (1H, d), 5,26 (1H, s), 6,70 (1H, d), 7,02 (2H, dd), 7,22 (1H, d), 7,47 (3H, dd), 7,58 (1H, d), 10,60 (1H, s), 12,60 (1H, s). m/z: ES+ (Tia điện+) [M+H]⁺ 443.

(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

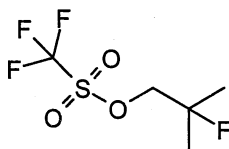
Quy trình điều chế 2-flo-2-metylpropan-1-ol



Lithi nhôm hydrit (3,37g, 88,56mmol) được bổ sung nhỏ giọt trong 15 phút vào dung dịch đã làm lạnh chứa etyl 2-flo-2-metylpropanoat (9,9g, 73,80mmol) trong dietyl ete (184mL) ở nhiệt độ 0°C. Phản ứng được khuấy trong 1 giờ, sau đó nước (3,3mL), sau đó dung dịch NaOH 15% (3,3mL) và nước (6,7mL) được bổ sung lần lượt vào. Hỗn dịch này được khuấy trong 15 phút, sau đó lọc và chất rắn được rửa bằng dietyl ete. Dịch lọc được làm bay hơi để thu được 2-flo-2-metylpropan-1-ol (5,90g, 87%) dưới dạng dầu không màu.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C) δ 1,37 (6H, d), 3,56 (2H, d), OH không quan sát thấy.

Quy trình khác để điều chế 2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat



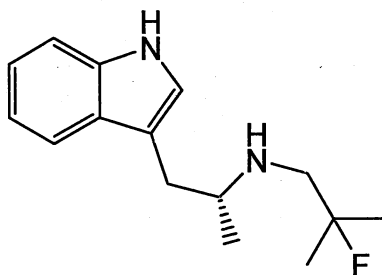
Triflometansulfonic anhydrit (12,06mL, 71,24mmol), sau đó 2,6-lutidin (11,42mL, 81,42mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 2-flo-2-metylpropan-1-ol (6,25g, 67,85mmol) trong DCM (146mL) ở nhiệt độ -10°C. Phản ứng được khuấy trong 1 giờ, sau đó rửa bằng HCl 2N (2 x 100mL) và dung dịch natri bicarbonat bão hòa (2 x 100mL).

Sau đó, pha hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4 và cô để thu được 2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (12,89g, 85%) dưới dạng dầu màu đỏ.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 27°C) δ 1,46 (6H, d), 4,41 (2H, d).

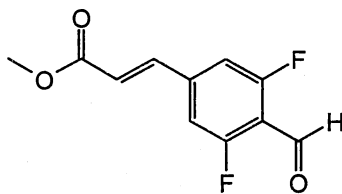
Hợp chất trung gian này có thể được tinh chế bằng cách cất chân không. Do nhiệt lượng quét vi sai cho thấy hợp chất này có khả năng tự nóng chảy. Vì lý do an toàn, nên tốt hơn nếu thiết bị bay hơi kiểu màng mỏng hoặc thiết bị tương tự có thể được sử dụng để chưng cất hàng loạt.

Quy trình khác để điều chế (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin



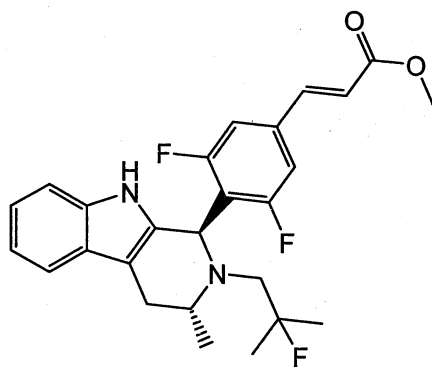
2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (8,04g, 35,87mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amin (5,00g, 28,70mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (7,44mL, 43,04mmol) trong đioxan (50mL). Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 90°C trong 3 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, phản ứng được pha loãng với EtOAc (200mL) và rửa bằng dung dịch natribicarbonat bão hòa (2 x 100mL). Pha nước được chiết bằng EtOAc (150mL), sau đó lớp hữu cơ thu gom được được làm khô bằng MgSO_4 và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradient rửa giải bằng 100% EtOAc. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin (6,49g, 91%) dưới dạng dầu màu nâu. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 27°C) δ 1,14 (3H, d), 1,31 (3H, d), 1,37 (3H, d), 1,94 (1H, s), 2,63 - 2,87 (3H, m), 2,92 (1H, dd), 3,07 (1H, h), 7,07 (1H, d), 7,08 - 7,15 (1H, m), 7,16 - 7,24 (1H, m), 7,37 (1H, d), 7,62 (1H, d), 8,04 (1H, s). m/z: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 249

Quy trình khác để điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat



4-brom-2,6-điflobenzaldehyt (9,99g, 45,20mmol) và metyl acrylat (6,14mL, 67,81mmol) được bổ sung vào DMA được đuổi khí kỹ (100mL) và tri-o-tolylphosphin (1,376g, 4,52mmol), paladi(II) axetat (0,507g, 2,26mmol) và trietylamin (12,60mL, 90,41mmol) được bổ sung vào. Phản ứng được khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong 6 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội và lọc qua đệm xelit, và rửa bằng metanol (50mL). Hợp chất thô được hấp thụ trước vào silica và tinh chế bằng phương pháp sắc ký hấp thụ rửa giải bằng dietyl ete/diclorometan ở gradien nồng độ nằm trong khoảng từ 0% đến 10%. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi và nghiền với dietyl ete (50mL) để thu được chất rắn màu vàng được nghiền với nước (50mL) và làm khô trong điều kiện chân không cao ở nhiệt độ 50°C để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat (8,85g, 87%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) δ 3,75 (3H, s), 6,93 (1H, d), 7,52 - 7,81 (3H, m), 10,18 (1H, s). Không quan sát thấy khối phổ ion trên LCMS.

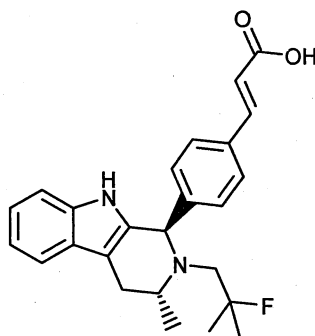
Quy trình khác để điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat (6,58g, 29,09mmol) được bổ sung vào hỗn dịch chứa (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin (6,02g, 24,24mmol) trong toluen (51,1mL) và axit axetic (2,78mL, 48,48mmol). Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột SCX-2. Hợp chất mong muốn được rửa giải khỏi cột bằng NH_3 7M /metanol và các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để

thu được chất rắn màu nâu. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 30% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất mong muốn (7,52g, 68,0%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 100°C) δ 1,10 (3H, d), 1,12 - 1,31 (6H, m), 2,28 - 2,72 (2H, m), 2,84 - 3,09 (2H, m), 3,52 - 3,69 (1H, m), 3,76 (3H, s), 5,30 (1H, s), 6,64 (1H, d), 6,9 - 7,11 (2H, m), 7,21 (1H, d), 7,32 (2H, d), 7,42 (1H, d), 7,58 (1H, d), 10,14 (1H, s). m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 457

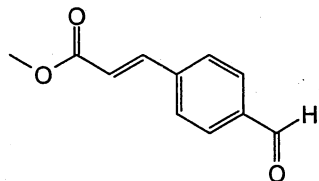
Ví dụ 2: axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic



Dung dịch natri hydroxit 7,5M (0,983mL, 7,37mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (310mg, 0,74mmol) trong metanol (5mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột SCX-2. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được rửa giải khỏi cột bằng amoniac 7M/metanol và các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được chất rắn màu vàng. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Waters SunFire, silica $5\mu\text{m}$, đường kính 50mm, chiều dài 100mm), bằng dung môi rửa giải là dung dịch nước phân cực giảm dần chứa 0,1% axit formic) và MeCN. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô, sau đó nạp vào cột SCX-2 và rửa giải bằng amoniac 7N trong metanol để thu được hợp chất mong muốn (63,0mg, 21,02%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1,06 (3H, d), 1,30 (3H, d), 1,47 (3H, d), 2,53 - 2,64 (2H, m), 2,79 (2H, s), 3,10 (1H, d), 5,08 (1H, s), 6,47 (1H, d), 6,98 (1H, t), 7,06 (1H, t), 7,19 - 7,37 (3H, m), 7,44 (1H, d), 7,56 (1H, d), 7,63 (2H, d), 10,81 (1H, s), 12,30 (1H, s). m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 407.

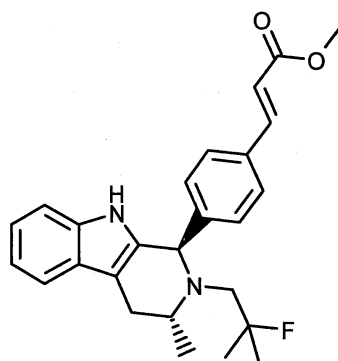
(E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-formylphenyl)acrylat



4-brombenzaldehyt (30g, 162,15mmol) và metyl acrylat (20,94g, 243,22mmol) được bổ sung vào DMA được đuổi khí kỹ (300mL) và xử lý bằng tri-o-tolylphosphin (4,94g, 16,21mmol), paladi(II) axetat (1,820g, 8,11mmol) và trietylamin (45,2mL, 324,29mmol) và gia nhiệt đến nhiệt độ 110°C trong 16 giờ. Phản ứng kết thúc hoàn toàn sau khoảng thời gian này. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước (4L) và chất kết thừa thu được được lọc và làm khô. Chất rắn này được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica, rửa giải bằng 100% heptan đến 30% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được thu gom và làm bay hơi đến khô để thu được chất rắn màu vàng product được nghiền với heptan, lọc và rửa bằng heptan lạnh. Chất rắn này được làm khô để thu được (E)-metyl 3-(4-formylphenyl)acrylat (25,6g, 83%) dưới dạng tinh thể màu vàng. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 3,75 (3H, s), 6,79 (1H, d), 7,72 (1H, d), 7,93 (4H, s), 10,03 (1H, s). Không quan sát thấy khối phổ ion trên LCMS.

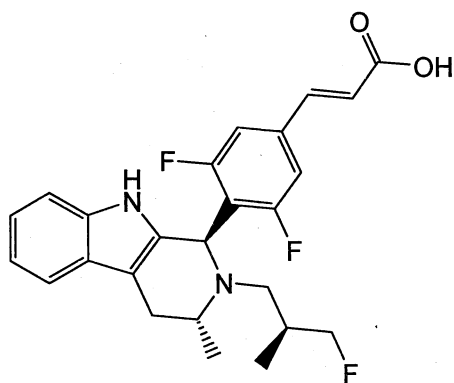
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



(R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin (được điều chế như trong ví dụ 1, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (450mg, 1,81mmol) và (E)-metyl 3-(4-formylphenyl)acrylat (345mg, 1,81mmol) được hòa tan trong toluen (15mL),

axit axetic (5mL) và chất rây phân tử được bổ sung vào. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 16 giờ trong điều kiện khí nitơ, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột SCX-2. Hợp chất mong muốn được rửa giải khỏi cột bằng amoniac 7M/metanol và các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất thô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 30% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (317mg, 41,6%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 1,09 (3H, d), 1,30 (3H, d), 1,47 (3H, d), 2,48 - 2,78 (4H, m), 3,30 (1H, m), 3,79 (3H, s), 5,09 (1H, s), 6,40 (1H, d), 7,12 (1H, td), 7,17 (1H, td), 7,29 (1H, d), 7,34 (2H, d), 7,43 (2H, d), 7,54 (1H, d), 7,66 (2H, m). m/z: ES+ [M+H]⁺ 421.

Ví dụ 3: axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic



Dung dịch natri hydroxit 2M (3,0mL, 6,00mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (275mg, 0,60mmol) trong THF (1,5mL)/metanol (1,5mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. EtOAc (15mL) và nước (15mL) được bổ sung vào, sau đó dung dịch nước này được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng 7 bằng HCl 2N. Các lớp được phân tách và lớp nước được chiết bằng EtOAc (15mL). Lớp hữu cơ thu gom được làm khô bằng Na₂SO₄ và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% metanol trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất mong muốn (250mg, 94%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

nhạt. ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 0,77 (3H, d), 1,06 (3H, d), 1,93 (1H, m), 2,18 (1H, dd), 2,58 (1H, dd), 2,65 (1H, dd), 2,84 (1H, dd), 3,35 (1H, dd), 4,32 (1H, d), 4,44 (1H, d), 5,16 (1H, s), 6,67 (1H, d), 6,93 - 7,04 (2H, m), 7,21 (1H, d), 7,42 (1H, d), 7,46 (2H, m), 7,54 (1H, d), 10,57 (1H, s), 12,51 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]⁺ 443.

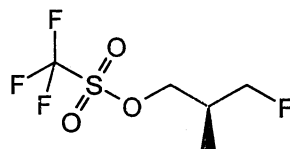
(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

Quy trình điều chế (S)-3-flo-2-metylpropan-1-ol



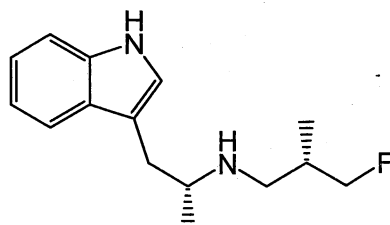
N,N-đietyl-1,1,2,3,3,3-hexaflopropan-1-amin (18,25mL, 100,57mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa (R)-metyl 3-hydroxy-2-metylpropanoat (9,25mL, 83,81mmol) trong DCM (77mL) (nhiệt độ phản ứng tăng lên khoảng 40°C). Phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó gia nhiệt đến nhiệt độ hồi lưu trong 4 giờ, trước khi làm nguội đến nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước đá, và các lớp được phân tách. Lớp nước được chiết bằng DCM (2 x 150mL), sau đó lớp hữu cơ thu gom được được làm khô và cô từ từ. Phần cặn được hòa tan trong THF (200mL) và làm lạnh trong bể nước đá. Lithi nhôm hydrit (6,45g, 167,61mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào trong 15 phút. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và gia nhiệt đến nhiệt độ phòng trong 1 giờ nữa. Sau khi làm lạnh trong bể nước đá, phản ứng được dừng bằng nước (7mL), sau đó NaOH 15% (7mL), và cuối cùng nước (21mL). MgSO_4 được bổ sung vào cho đến khi tạo ra chất rắn dạng hạt. Chất rắn này được lọc qua đệm xelit và chất rắn thu được được rửa bằng đietyl ete (50mL). Dịch lọc được rửa bằng HCl 2N (2 x 100mL), sau đó pha hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4 và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% EtOAc trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (S)-3-flo-2-metylpropan-1-ol (6,42g, 83%) dưới dạng dầu màu vàng rom. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 0,97 (3H, dd), 1,96 - 2,14 (1H, m), 3,64 (2H, d), 4,3 - 4,42 (1H, m), 4,42 - 4,54 (1H, m), OH không quan sát thấy.

Quy trình điều chế (S)-3-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat



Bổ sung nhỏ giọt triflometansulfonic anhydrit (17,31mL, 102,92mmol) vào dung dịch được khuấy chứa (S)-3-flo-2-metylpropan-1-ol (7,9g, 85,77mmol) trong DCM (140mL) ở nhiệt độ 0°C, sau đó bổ sung nhỏ giọt 2,6-đimetylpyridin vào (11,95mL, 102,92mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 45 phút và nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng với DCM (60mL), và bổ sung lần lượt HCl 1M (3 x 100mL), dung dịch natri bicarbonat bão hòa (100mL) và nước muối bão hòa (50mL) vào. Lớp hữu cơ được làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi đến gần khô. Dung dịch này được lọc qua đệm silica và rửa bằng DCM (50mL) và làm bay hơi để thu được (S)-3-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (14,38g, 74,8%) dưới dạng dầu màu nâu. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C) δ 1,09 (3H, dd), 2,24 - 2,44 (1H, m), 4,30 (0,5H, dd), 4,37 - 4,46 (1H, m), 4,52 (2,5H, tt).

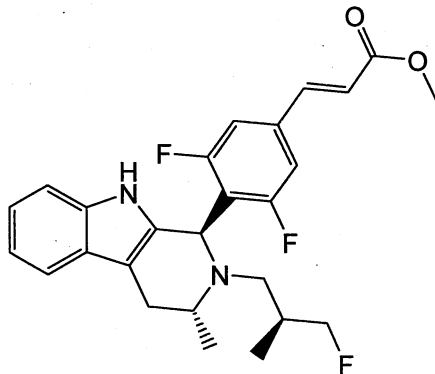
Quy trình điều chế (S)-N-((R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-3-flo-2-metylpropan-1-amin



(S)-3-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (666mg, 2,97mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amin (470mg, 2,7mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (0,700mL, 4,05mmol) trong 1,4-đioxan (6,05mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng với EtOAc (20mL) và rửa bằng nước (20mL). Lớp nước được chiết bằng EtOAc (2 x 20mL), sau đó lớp hữu cơ thu gom được làm khô (MgSO₄) và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% metanol trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (S)-N-((R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-3-flo-2-metylpropan-1-amin (590mg, 88%) dưới dạng dầu màu nâu. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 0,86 (3H, dd), 1,20 (3H, d), 1,94 - 2,11 (1H, m), 2,64-2,74 (2H, m), 2,85 - 2,98 (2H, m), 3,05 - 3,15 (1H, m), 4,13 -

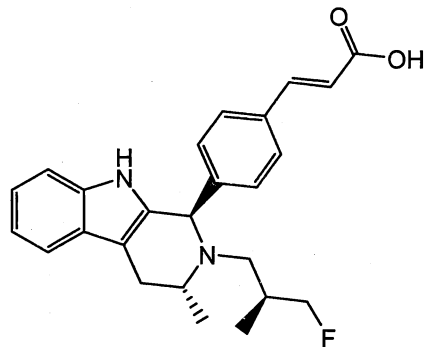
4,39 (2H, m), 7,09 (1H, d), 7,12 (2H, ddd), 7,20 (1H, ddd), 7,33 - 7,41 (1H, m), 7,56 - 7,65 (1H, m), 8,10 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]⁺ 249

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



Axit axetic (2,0mL) được bổ sung vào dung dịch chứa (S)-N-((R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-3-flo-2-metylpropan-1-amin (273mg, 1,10mmol) và (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat (được điều chế như trong ví dụ 1, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (226mg, 1mmol) trong toluen (8,0mL). Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 95°C trong 2,5 giờ. Các chất bay hơi được loại bỏ trong điều kiện chân không, sau đó phần cặn được nạp qua cột SCX-2. Sau đó, cột này được rửa giải bằng amoniac 7M/metanol để thu được hợp chất thô. Dịch lọc được cô và hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% metanol trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (282mg, 61,8%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 0,82 (3H, d), 1,12 (3H, d), 1,81 - 1,99 (1H, m), 2,24 (1H, ddd), 2,64 (1H, ddd), 2,71 (1H, dd), 2,93 - 3,01 (1H, ddd), 3,42 (1H, dq), 3,81 (3H, s), 4,25 - 4,39 (1H, m), 4,38 - 4,53 (1H, m), 5,20 (1H, s), 6,39 (1H, d), 6,99 (2H, m), 7,06 - 7,16 (2H, m), 7,21 - 7,25 (1H, m), 7,52 (3H, m). m/z: ES+ [M+H]⁺ 457.

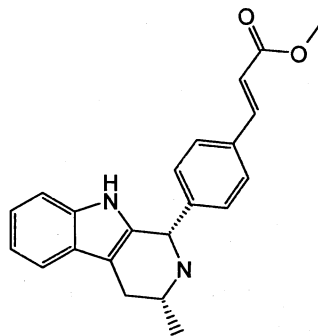
Ví dụ 4: axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic



Dung dịch natri hydroxit 7,5M (0,904mL, 6,78mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-methyl 3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (285mg, 0,68mmol) trong metanol (3mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột SCX-2. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được rửa giải khỏi cột bằng amoniac 7M/metanol và các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được chất rắn màu vàng. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp LCMS điều chế (cột Phenomenex Gemini-NX axia Prep C18 OBD, silica 5µm, đường kính 50mm, chiều dài 100mm), bằng dung môi rửa giải là dung dịch nước phân cực giảm dần chứa 1% NH₃) và MeCN. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất mong muốn (80mg, 29,0%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 33°C) δ 0,87 (3H, d), 1,04 (3H, d), 1,91 - 2,27 (2H, m), 2,50 (1H, p), 2,57 - 2,75 (2H, m), 3,13 (1H, s), 4,51 (2H, dd), 4,86 (1H, s), 6,47 (1H, d), 6,92 - 6,99 (1H, m), 7 - 7,09 (1H, m), 7,15 - 7,35 (3H, m), 7,35 - 7,5 (2H, m), 7,57 (2H, d), 10,64 (1H, d), CO₂H không quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]⁺ 407.

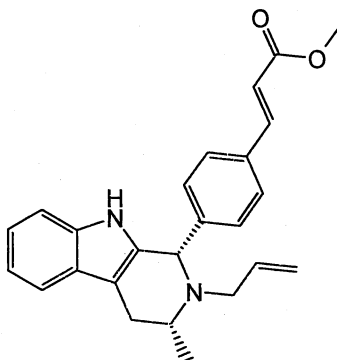
(E)-methyl 3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

Quy trình điều chế (E)-methyl 3-(4-((1S,3R)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



(E)-metyl 3-(4-formylphenyl)acrylat (được điều chế như trong ví dụ 2, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (18,56g, 97,57mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa (R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amin (17g, 97,57mmol) trong axit axetic (250mL) ở nhiệt độ 23°C trong điều kiện khí nitơ. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi đến khô và hòa tan lại trong DCM (500mL), và bổ sung lần lượt dung dịch natri bicarbonat bão hòa (300mL x 2), dung dịch nước NaOH 2M (300mL), nước (300mL), và nước muối bão hòa (300mL) vào. Lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 , lọc và làm bay hơi để thu được hợp chất thô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 1 đến 7% metanol trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (25,1g, 74,3%) dưới dạng bột màu be. Hợp chất này chủ yếu là chất đồng phân *cis*, chứa khoảng 12% chất đồng phân *trans* mà không thể phân tách. ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1,25 (3H, d), 2,37 - 2,48 (1H, m), 2,74 (1H, d), 3,12 (1H, s), 3,73 (3H, s), 5,18 (1H, s), 6,64 (1H, d), 6,97 (2H, dd), 7,19 (1H, d), 7,36 - 7,46 (3H, m), 7,64 - 7,75 (3H, m), 10,19 (1H, s), không quan sát thấy NH. m/z: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 347$.

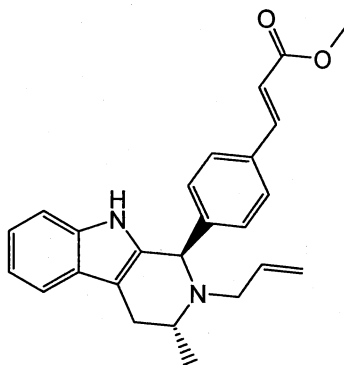
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



(E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (35g, 101,03mmol), 3-bromprop-1-en (9,62mL, 111,14mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (19,36mL, 111,14mmol) được tạo hỗn dịch trong axetonitril (160mL), khí nitơ được thổi vào trong 5 phút, sau đó hỗn hợp này được đổ vào ống vi sóng kín. Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 140°C trong 3,5 giờ trong thiết bị phản ứng vi sóng và làm nguội đến nhiệt độ phòng.

Hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi đến khô và hòa tan lại trong DCM (100mL), và bổ sung lần lượt axit xitric 1M (100mL), nước (100mL), và nước muối bão hòa (100mL) vào. Lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 , lọc và làm bay hơi để thu được hợp chất thô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 20% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hỗn hợp theo tỷ lệ 50:50 chứa (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat : (E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (10,00g, 25,6%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. m/z: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 387.

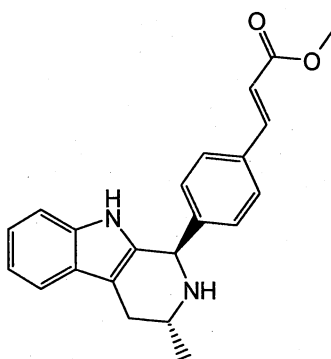
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



Axit trifloaxetic (5,59mL, 75,29mmol) được bổ sung vào (E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (9,7g, 25,10mmol) trong DCM (100mL) ở nhiệt độ 20°C trong điều kiện khí nitơ. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 3 ngày. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng từ từ bằng dung dịch natri bicarbonat bão hòa (250mL), và lớp DCM được rửa lần lượt bằng nước (250mL) và nước muối bão hòa (250mL). Lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 , lọc và làm bay hơi để thu được hợp chất thô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương

pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 10% đến 20% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn được làm bay hơi đến khô để thu được hỗn hợp theo tỷ lệ 65:35 chứa (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat: (E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (7,99g, 82%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 387

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat

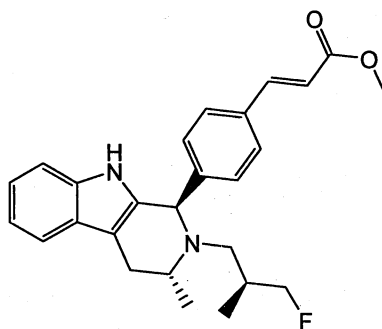


7 Lô riêng biệt chứa hỗn hợp theo tỷ lệ 65:35 chứa (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat: (E)-metyl 3-(4-((1S,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (2,00g, 5,17mmol) được điều chế như sau.

(E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-allyl-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (2,00g, 5,17mmol) và clotris(triphenylphosphin)rodi(I) (chất xúc tác Wilkinson) (2,346g, 2,54mmol) được tạo hỗn dịch trong axetonitril (12mL) và nước (2,4mL) và khí nitơ được thổi vào trong 5 phút trước khi đổ vào ống vi sóng kín. Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 100°C trong 60 phút trong thiết bị phản ứng vi sóng và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được thu gom và làm bay hơi đến khô và hòa tan lại trong DCM (200mL) và dung dịch natri bicarbonat bão hòa (200mL) được bổ sung vào. Lớp hữu cơ được rửa lần lượt bằng nước (200mL) và nước muối bão hòa (200mL) trước khi làm khô bằng MgSO₄, lọc và làm bay hơi để thu được hợp chất thô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải 0 đến 5% metanol trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (7,02g, 55,9%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ¹H NMR

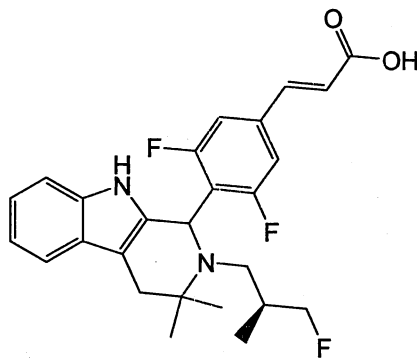
(400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1,14 (3H, d), 2,27 - 2,4 (1H, m), 2,81 (1H, dd), 2,94 - 3,05 (1H, m), 3,72 (3H, s), 5,19 (1H, s), 6,60 (1H, d), 6,94 - 7 (1H, m), 7,01 - 7,09 (1H, m), 7,26 (3H, d), 7,43 (1H, d), 7,59 - 7,68 (3H, m), 10,70 (1H, s), NH không quan sát thấy.
m/z: ES+ [M+H]⁺ 347

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat



(S)-3-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (được điều chế như trong ví dụ 3, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (291mg, 1,30mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (300mg, 0,87mmol) và N,N-diisopropyletylamin (0,226mL, 1,30mmol) trong 1,4-đioxan (5mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 90°C trong 1 giờ, sau đó hỗn hợp này được làm bay hơi đến khô và phần cặn được phân lớp giữa DCM (30mL) và nước (30mL). Lớp nước được chiết bằng DCM (30mL) và dịch chiết được kết hợp với lớp hữu cơ. Dịch chiết thu gom được được lọc qua giấy lọc và làm bay hơi. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, dung môi rửa giải EtOAc 15% trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (314mg, 86%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 0,87 (3H, d), 1,06 (3H, d), 1,9 - 2,28 (2H, m), 2,55 - 2,8 (3H, m), 2,97 - 3,21 (1H, m), 3,72 (3H, s), 4,31 - 4,69 (2H, m), 4,88 (1H, s), 6,60 (1H, dd), 6,98 (1H, t), 7,04 (1H, t), 7,17 - 7,35 (3H, m), 7,44 (1H, d), 7,55 - 7,76 (3H, m), 10,65 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]⁺ 421.

Ví dụ 5: axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 1)*

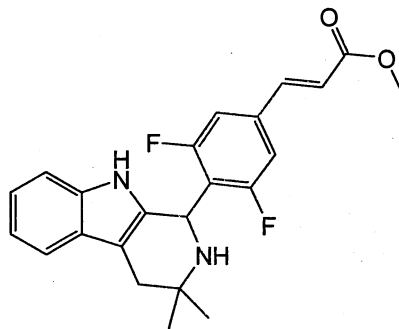


Natri hydroxit (184mg, 4,61mmol) được bổ sung vào (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyriđo[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) (217mg, 0,46mmol) trong THF (1mL)/metanol (1mL). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 16 giờ. Phản ứng được pha loãng với nước (10mL) và điều chỉnh đến độ pH = 7 bằng HCl 2N. Dung dịch này được chiết bằng EtOAc (2 x 20mL). Lốp hữu cơ thu gom được được làm khô bằng Na₂SO₄ và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 50% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi để thu được hợp chất thô. Hợp chất thô được nghiền bằng hỗn hợp dietyl ete/isohexan để thu được hợp chất mong muốn (53,0mg, 25,2%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) δ 0,54 (3H, d), 1,06 (3H, s), 1,34 (3H, s), 2,14 (1H, dd), 2,66 (1H, d), 2,83 (1H, d), 3,03 (1H, dd), 4,21 (1H, t), 4,33 (1H, t), 5,12 (1H, s), 6,73 (1H, d), 7,01 (2H, dtd), 7,14 - 7,28 (1H, m), 7,43 (1H, d), 7,54 (2H, s), 7,59 (1H, d), 10,50 (1H, s), 12,61 (1H, s), CO₂H không quan sát thấy. m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 457

*Hóa lập thể được suy luận là (R) ở tâm không xác định bởi độ tương đồng với các hợp chất theo các ví dụ khác, tức là hợp chất được suy luận là: axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(1R)-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyriđo[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic

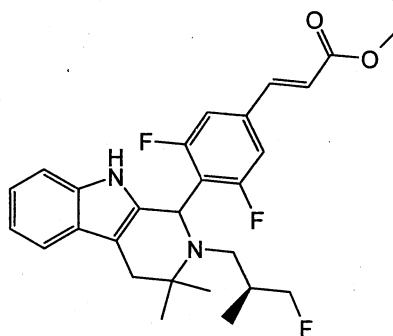
3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyriđo[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyriđo[3,4-b]indol-1-yl)-3,5-điflophenyl)acrylat



1-(1H-indol-3-yl)-2-methylpropan-2-amin (807mg, 4,29mmol) và (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat (được điều chế như trong ví dụ 1, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (970mg, 4,29mmol) được thu gom trong axit axetic (15mL) và hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột SCX-2. Hợp chất mong muốn được rửa giải khỏi cột bằng amoniac 2M trong metanol và các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-3,5-điflophenyl)acrylat (1610mg, 95%) dưới dạng bột màu vàng. ^1H NMR (500 MHz, DMSO, 20°C) δ 1,15 (3H, s), 1,27 (3H, s), 2,23 (1H, s), 2,61 (2H, s), 3,75 (3H, s), 5,46 (1H, s), 6,84 (1H, d), 6,97 (2H, dtd), 7,18 (1H, d), 7,39 (1H, d), 7,58 (2H, s), 7,67 (1H, d), 10,60 (1H, s). m/z: ES⁻ [M-H]⁻ 395.

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1)

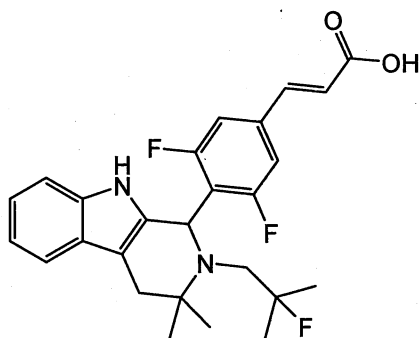


(S)-3-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (được điều chế như trong ví dụ 3, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (0,339g, 1,51mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-3,5-điflophenyl)acrylat (0,3g, 0,76mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (0,458mL, 2,65mmol) trong 1,4-đioxan (2mL). Quá trình khuấy được tiếp tục trong 24 giờ, sau đó các chất bay hơi được loại bỏ trong điều kiện chân không và hợp chất thô được tinh chế

bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 25% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (0,202g, 36%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất này được kết hợp với một lô hợp chất khác (0,36g) và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Chiralpak IA, silica 20 μ m, đường kính 20mm, chiều dài 250mm), Heptan:IPA 70:30 ở tốc độ dòng bằng 80mL/phút (4 lần tiêm mẫu). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1, được rửa giải trước, 217mg) và (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 2, được rửa giải sau, 165mg). Phân tích được thực hiện trên cột Chiralpak IA, silica 5 μ m, đường kính 4,6mm, chiều dài 50mm, Heptan:IPA 70:30 ở tốc độ dòng 2mL/phút.

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 0,50 (3H, d), 1,02 (3H, s), 1,30 (3H, s), 2,11 (1H, dd), 2,62 (2H, d), 2,80 (1H, d), 2,99 (1H, dd), 3,74 (3H, s), 4,09 - 4,23 (1H, m), 4,29 (1H, d), 5,09 (1H, s), 6,81 (1H, d), 6,97 (2H, dt), 7,16 (1H, d), 7,39 (1H, d), 7,53 (2H, d), 7,64 (1H, d), 10,44 (1H, s). m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 471.

Ví dụ 6: axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 1)*



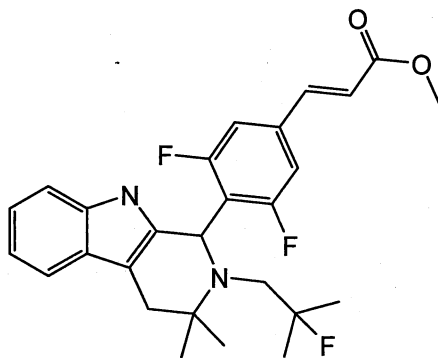
Dung dịch natri hydroxit 2M (1,6mL, 3,20mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) (148mg, 0,31mmol) trong THF (0,8mL)/metanol (0,8mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. EtOAc (15mL) và nước (15mL) được bổ sung vào, và dung dịch nước này được điều

chỉnh đến độ pH bằng khoảng 7 bằng HCl 2N. Các lớp được phân tách, và lớp nước được chiết bằng EtOAc (15mL). Lớp hữu cơ thu gom được làm khô bằng Na₂SO₄ và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 25% đến 100% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất mong muốn (chất đồng phân 1) (124mg, 86%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 1,03 (3H, d), 1,08 (3H, s), 1,16 (3H, d), 1,35 (3H, s), 2,56 (1H, dd), 2,66 (1H, d), 3,02 (1H, d), 3,17 (1H, dd), 5,24 (1H, s), 6,39 (1H, d), 7,00 (2H, d), 7,05 - 7,16 (2H, m), 7,20 (1H, dd), 7,28 (1H, s), 7,49 (1H, dd), 7,61 (1H, d), CO₂H không quan sát thấy. m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 457.

* Hóa lập thể được suy luận là (R) ở tâm không xác định bởi độ tương đồng với các hợp chất theo các ví dụ khác.

(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

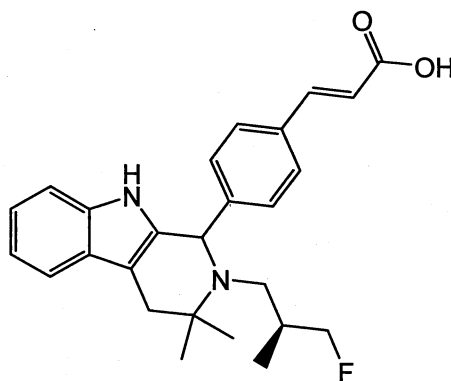
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1)



2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (được điều chế như trong ví dụ 1, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (679mg, 3,03mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-3,5-điflophenyl)acrylat (được điều chế như trong ví dụ 5, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (600mg, 1,51mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (0,915mL, 5,30mmol) trong 1,4-dioxan (2,5mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó phản ứng này được gia nhiệt đến nhiệt độ 105°C trong 88 giờ. Các chất bay hơi được loại bỏ trong điều kiện chân không và hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 50% EtOAc trong heptan. Các

phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (430mg, 60,4%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất raxemic này được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Chiralpak AD, silica 20 μ m, đường kính 50mm, chiều dài 250mm), Heptan:Etanol 90:10 ở tốc độ dòng bằng 90 mL/phút. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1, được rửa giải trước, 149mg, 34,6%) và (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 2, được rửa giải sau, 143mg, 33,3%) dưới dạng chất rắn màu kem. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 1,01 (3H, d), 1,08 (3H, s), 1,15 (3H, d), 1,34 (3H, s), 2,55 (1H, dd), 2,66 (1H, d), 2,98 - 3,06 (1H, m), 3,17 (1H, dd), 3,80 (3H, s), 5,23 (1H, s), 6,38 (1H, d), 6,97 (2H, d), 7,07 - 7,12 (2H, m), 7,17 - 7,22 (1H, m), 7,32 (1H, s), 7,46 - 7,5 (1H, m), 7,52 (1H, d). m/z ES $^-$ [M-H] $^-$ 469.

Ví dụ 7: axit (E)-3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 1)*



Dung dịch natri hydroxit 2M (20,42mL, 40,85mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) (3,55g, 8,17mmol) trong metanol (100mL), THF (100mL) và nước (75mL). Hỗn hợp này được gia nhiệt ở nhiệt độ 40°C trong 16 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng với nước (100mL) và cô đến thể tích sao cho dung môi hữu cơ đã được tách ra. Dung dịch nước thu được được axit hóa đến độ pH = 6 bằng HCl 2M. Hỗn dịch nước thu được được chiết bằng DCM (500mL) (bổ sung nước muối để giúp phân tách nhũ tương được tạo ra), lọc qua giấy lọc, làm khô bằng

MgSO₄, sau đó lọc qua đệm xelit và làm bay hơi để thu được khoảng 3,5g chất rắn màu vàng be. Hợp chất thô được xử lý với diethyl ete/DCM (1:1, 150mL) và siêu âm. Hỗn dịch mịn thu được được lọc qua đệm silica (khoảng 100g) và silica được rửa giải bằng diethyl ete (khoảng 2L). Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được thu gom, làm bay hơi và làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ 50°C để thu được hợp chất mong muốn (2,305g, 64,5%) dưới dạng chất rắn màu be. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 0,52 (3H, d), 1,03 (3H, s), 1,05 - 1,16 (1H, m), 1,23 (3H, s), 2,21 (1H, dd), 2,65 (1H, d), 2,84 (1H, d), 2,89 (1H, dd), 4,19 (1H, ddd), 4,31 (1H, ddd), 4,66 (1H, s), 6,50 (1H, d), 6,93 (1H, ddd), 6,98 (1H, ddd), 7,18 (1H, d), 7,38 (2H, d), 7,40 (1H, d), 7,58 (1H, d), 7,63 (2H, d), 10,18 (1H, s), 12,30 (1H, s). m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 421.

* Hóa lập thể được suy luận là (R) ở tâm không xác định bởi độ tương đồng với các hợp chất theo các ví dụ khác.

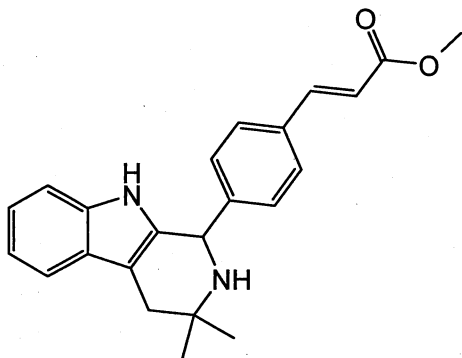
Hợp chất này (9,0g, 21,40mmol) được tạo hỗn dịch đặc trong axetonitril (150mL) trong điều kiện khí nitơ trong bóng tối trong 1 giờ trong bình đáy tròn dung tích 250mL được đậy nắp. Hỗn hợp này được khuấy trong 1 tuần ở nhiệt độ phòng, sau đó lọc và rửa bằng axetonitril lạnh (60mL) để thu được chất rắn màu trắng được làm khô trong điều kiện chân không cao ở nhiệt độ 40°C trong 5 giờ để thu được dạng tinh thể A của hợp chất mong muốn (7,81g, 87%).

Mẫu nhiễu xạ bột tia X của dạng tinh thể A bao gồm các cực đại sau và thể hiện trên Fig.1.

2-Theta°	%
4,48	100
10,76	42,2
9,88	21,4
6,13	20,8
13,41	18,9
14,01	18,2
14,31	14,7
18,46	13,2
7,92	12,2
4,76	9,3

(E)-metyl 3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

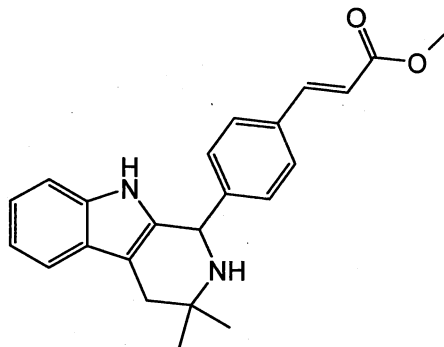
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (raxemat)



(E)-metyl 3-(4-formylphenyl)acrylat (41,8g, 219,62mmol) (được điều chế như trong ví dụ 2, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) được bổ sung một phần vào 1-(1H-indol-3-yl)-2-metylpropan-2-amin (43,8g, 219,62mmol) trong axit axetic (314mL) trong điều kiện khí nitơ. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện chân không. Toluene (200mL) được bổ sung vào và phần cặn được làm bay hơi đến khô.

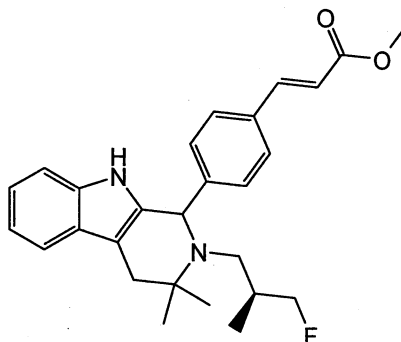
Xử lý hỗn hợp đẳng phí được lặp lại nhiều hơn hai lần để thu được chất rắn màu nâu. Hợp chất này được khuấy trong EtOAc/heptan theo tỷ lệ 1:1 (500mL) trong 30 phút trước khi lọc và rửa bằng EtOAc/heptan theo tỷ lệ 1:1. Hợp chất được làm khô trong không khí để thu được chất rắn màu trắng. Hợp chất thô này được tạo hỗn dịch trong 2-metyl tetrahydrofuran (750mL), và dung dịch natri bicarbonat bão hòa được bổ sung vào trong 10 phút to hỗn hợp đã được khuấy (sủi bọt), hỗn hợp này được khuấy cho đến khi hợp chất hòa tan và pha nước vẫn có tính bazơ. Các pha được phân tách và pha hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô bằng MgSO₄, lọc và cô trong điều kiện chân không để thu được bột màu vàng nhạt (khoảng 78g). Hợp chất này được hòa tan trong dietyl ete (200mL) và cô đến khô (lặp lại hai lần). Trong lần bổ sung thứ hai, thu được chất rắn thích hợp. Hợp chất này được khuấy trong dietyl ete và làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (raxemat) (73,6g, 89%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 1,26 (3H, s), 1,35 (3H, s), 1,42 (1H, br s), 2,69 - 2,82 (2H, m), 3,80 (3H, s), 5,12 (1H, s), 6,41 (1H, d), 7,06 - 7,16 (2H, m), 7,21 (1H, dd), 7,37 (2H, d), 7,46 - 7,54 (4H, m), 7,67 (1H, d). m/z: ES+ [M+H]⁺ 361.

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1)



(E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (raxemat) (65g) được tinh chế trong bảy lần tiêm như sau. Hợp chất raxemic này được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Chiralpak OD, silica 20 μ m, đường kính 100mm, chiều dài 250mm), Heptan:IPA 50:50. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1, được rửa giải trước, 30,3g, 93%) và (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 2, được rửa giải sau, 28,2g, 86%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30 $^\circ\text{C}$) δ 1,27 (3H, s), 1,36 (3H, s), 2,69 - 2,82 (2H, m), 3,80 (3H, s), 5,14 (1H, s), 6,43 (1H, d), 7,12 (2H, pd), 7,2 - 7,24 (1H, m), 7,39 (3H, d), 7,51 (3H, d), 7,68 (1H, d), NH không quan sát thấy. m/z: ES+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 361.

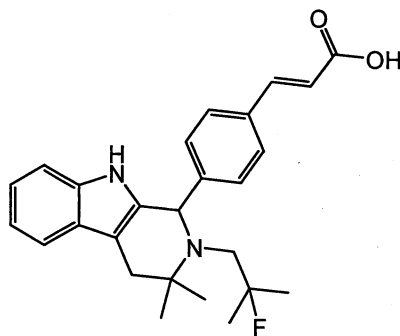
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1)



(S)-3-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (được điều chế như trong ví dụ 3, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (5,32g, 21,36mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-

yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) (3,5g, 9,71mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (6,34mL, 36,41mmol) trong 1,4-dioxan (17,5mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 22°C trong 3 ngày. Hỗn hợp này được làm bay hơi và phần cặn được phân lớp giữa DCM (150mL) và nước (150mL). Lớp nước được chiết bằng DCM (50mL) và dịch chiết được kết hợp với lớp hữu cơ. Dịch chiết thu gom được được lọc qua giấy lọc và làm bay hơi. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, dung môi rửa giải EtOAc 15% trong heptan. Các phân đoạn chứa lượng đáng kể hợp chất bắt đầu chuyển sang dạng tinh thể; các bình phản ứng được khuấy để tiếp tục kết tinh. Lọc thu nhận các tinh thể và rửa bằng lượng nhỏ EtOAc 15% trong heptan để thu được (E)-metyl 3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) (2,91g, 69,0%) dưới dạng tinh thể rắn màu trắng. Dịch kết tinh và các phân đoạn khác chứa hợp chất mong muốn được thu gom và làm bay hơi. Phần cặn được tái kết tinh từ EtOAc/heptan để thu được nhiều hơn 3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) dưới dạng tinh thể rắn màu trắng (635mg, 15,1%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 0,53 (3H, d), 0,95 - 1,07 (1H, m), 1,09 (3H, s), 1,32 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,66 (1H, d), 2,94 (1H, d), 2,97 (1H, d), 3,80 (3H, s), 4,14 (1H, ddd), 4,31 (1H, ddd), 4,59 (1H, s), 6,42 (1H, d), 7,05 - 7,11 (2H, m), 7,13 (1H, s), 7,17 (1H, dd), 7,35 (2H, d), 7,45 (2H, d), 7,50 (1H, dd), 7,67 (1H, d). m/z: ES+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 435.

Ví dụ 8: axit (E)-3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 1)*



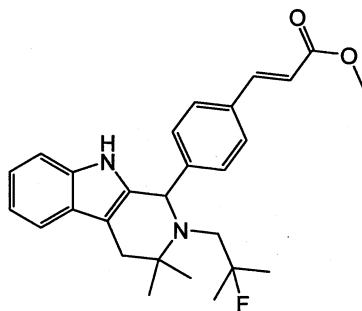
Dung dịch natri hydroxit 2M (0,782mL, 1,56mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) (68mg, 0,16mmol) trong metanol (5mL), THF (5,00mL) và nước (5,00mL) và hỗn hợp này được khuấy trong 40

giờ ở nhiệt độ 22°C. Hỗn hợp này được cô đến thể tích sao cho toàn bộ dung môi hữu cơ đã được tách ra và axit hóa đến pH = 6 bằng HCl 2M. Dung dịch nước amoniac đặc (2 giọt) được bổ sung vào, sau đó metanol (khoảng 2mL) được bổ sung vào để thu được dung dịch màu vàng nhạt. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, silica 5 μ m, đường kính 50mm, chiều dài 100mm), bằng dung môi rửa giải là dung dịch nước phân cực giảm dần chứa 1% NH₃) và MeCN. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được hợp chất mong muốn (chất đồng phân 1) (50,0mg, 76%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 30°C) δ 0,93 (3H, s), 1,19 (3H, d), 1,23 (3H, s), 1,51 (3H, d), 2,56 - 2,64 (2H, m), 2,75 (1H, d), 3,04 (1H, dd), 5,06 (1H, s), 6,40 (1H, d), 7,03 (1H, ddd), 7,09 - 7,15 (2H, m), 7,35 (1H, dd), 7,44 - 7,51 (5H, m), 10,87 (1H, s), CO₂H không quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]⁺ 421.

*Hóa lập thể được suy luận là (R) ở tâm không xác định bởi độ tương đồng với các hợp chất theo các ví dụ khác.

(E)-metyl 3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

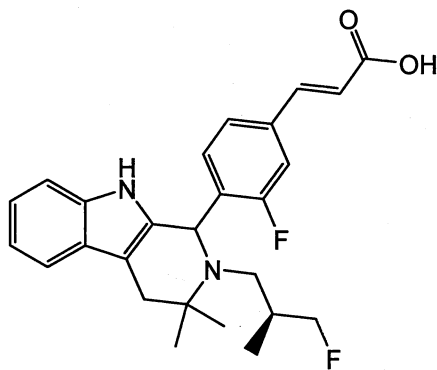
Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1)



2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (được điều chế như trong ví dụ 1, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (389mg, 1,73mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (raxemat) (được điều chế như trong ví dụ 7, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (250mg, 0,69mmol) và N,N-điisopropyletylamin (0,453mL, 2,60mmol) trong 1,4-dioxan (1,25mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 95°C trong 64 giờ, sau

đó phân lớp giữa DCM (30mL) và nước (30mL). Lớp nước được chiết bằng DCM (20mL) và dịch chiết được kết hợp với lớp hữu cơ. Dịch chiết thu gom được được lọc qua giấy lọc và làm bay hơi. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, dung môi rửa giải EtOAc 15% trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (raxemat) (178mg, 59,1%) dưới dạng chất rắn màu be. Hợp chất raxemic này được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Chiralpak AD, silica 20 μ m, đường kính 50mm, chiều dài 250mm), Heptan:Etanol: 80:20. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1, được rửa giải trước, 70mg) và (E)-metyl 3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 2, được rửa giải sau, 66mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 1,00 (3H, s), 1,13 (3H, d), 1,20 (3H, s), 1,44 (3H, d), 2,57 - 2,78 (3H, m), 2,93 (1H, dd), 3,80 (3H, s), 5,05 (1H, s), 6,41 (1H, d), 7,13 (1H, ddd), 7,18 (1H, ddd), 7,32 (1H, d), 7,43 (2H, d), 7,51 (2H, d), 7,54 (1H, d), 7,64 (1H, s), 7,67 (1H, d).m/z: ES+ [M+H] $^+$ 435.

Ví dụ 9: axit (E)-3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 1)*



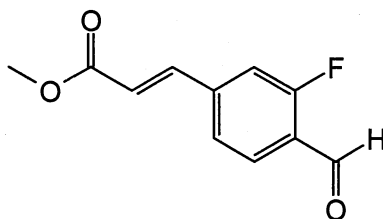
Dung dịch natri hydroxit 2M (3,31mL, 6,63mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (600mg, 1,33mmol) (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang) trong metanol (5mL), and THF (20mL) và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 4 giờ. Hỗn hợp này được cô đến thể tích sao cho toàn bộ dung môi hữu cơ đã được tách ra, pha loãng bằng nước (50mL), axit hóa bằng HCl loãng đến

pH = 6 và chiết bằng etyl axetat (2 x 50mL). Dịch chiết được thu gom và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Chiralpak IA, silica 20 μ m, đường kính 20mm, chiều dài 250mm), Heptan:IPA 90:10, 0,2% axit axetic ở tốc độ dòng bằng 80mL/phút. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được thu gom và phân tích để thu được axit (E)-3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 1, được rửa giải trước, 130mg, 22,36%) và axit (E)-3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (chất đồng phân 2, được rửa giải sau, 30,0mg, 5,16%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 30°C) δ 0,49 (3H, d), 1,03 (3H, s), 1,14 - 1,21 (1H, m), 1,28 (3H, s), 2,17 (1H, dd), 2,59 - 2,71 (1H, m), 2,8 - 2,99 (2H, m), 4,09 - 4,34 (2H, m), 4,99 (1H, s), 6,59 (1H, d), 6,86 - 7,07 (2H, m), 7,1 - 7,19 (1H, m), 7,18 - 7,29 (1H, m), 7,36 - 7,49 (2H, m), 7,49 - 7,66 (2H, m), 10,31 (1H, s), CO₂H không quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]⁺ 439.

*Hóa lập thể được suy luận là (R) ở tâm không xác định bởi độ tương đồng với các hợp chất theo các ví dụ khác.

(E)-metyl 3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3-flo-4-formylphenyl)acrylat

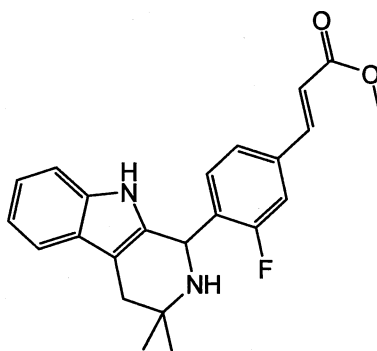


4-brom-2-flobenzaldehyt (20,88g, 102,87mmol) và metyl acrylat (13,98mL, 154,30mmol) được bổ sung vào DMA được đuổi khí kỹ (150mL) và tri-o-tolylphosphin (3,13g, 10,29mmol), paladi(II) axetat (1,155g, 5,14mmol) và trietylamin (28,7mL, 205,74mmol) được bổ sung vào. Phản ứng được khuấy và gia nhiệt đến nhiệt độ 100°C trong 16 giờ. Tri-o-tolylphosphin (3,13g, 10,29mmol) và paladi(II) axetat (1,155g, 5,14mmol) được bổ sung thêm vào và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 110°C trong 2 giờ nữa. Nước (1L) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được chiết bằng DCM (2 x 500mL). Các lớp hữu cơ thu gom được làm khô (MgSO₄), lọc và

làm bay hơi để thu được chất rắn màu nâu. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 25% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3-flo-4-formylphenyl)acrylat (15,20g, 71,0%) dưới dạng chất rắn màu vàng.

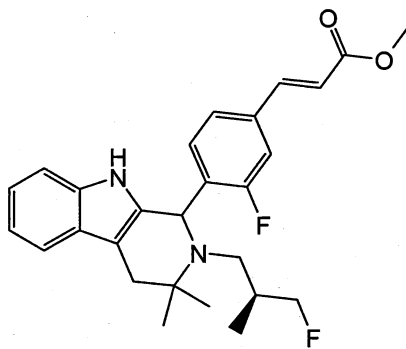
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 3,83 (3H, s), 6,53 (1H, d), 7,31 (1H, dd), 7,41 (1H, d), 7,65 (1H, d), 7,79 - 8 (1H, m), 10,25 - 10,41 (1H, m). Không quan sát thấy khối phổ ion trên LCMS.

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-3-flophenyl)acrylat (raxemat)



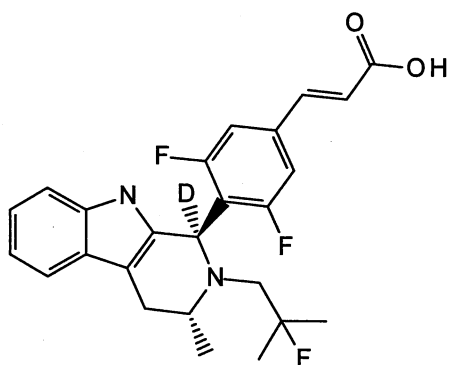
1-(1H-indol-3-yl)-2-metylpropan-2-amin (1g, 5,31mmol) và (E)-metyl 3-(3-flo-4-formylphenyl)acrylat (1,106g, 5,31mmol) trong axit axetic (15mL) được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ trong điều kiện khí nitơ. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột SCX-2. Hợp chất mong muốn được rửa giải khỏi cột bằng amoniac 7M/metanol và các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-3-flophenyl)acrylat (raxemat) (2,000g, 99%) . ^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1,14 (3H, s), 1,27 (3H, s), 2,52 - 2,74 (2H, m), 3,74 (3H, s), 5,12 (1H, s), 6,69 (1H, d), 6,86 - 7,05 (2H, m), 7,20 (1H, d), 7,25 - 7,33 (2H, m), 7,39 (1H, d), 7,73 (1H, d), 7,85 (1H, t), 10,29 (1H, s), NH không quan sát thấy. m/z: ES+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 379.

Quy trình điều chế (E)-metyl 3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang)



(S)-3-flo-2-methylpropyl triflometansulfonat (được điều chế như trong ví dụ 3, quy trình điều chế nguyên liệu ban đầu) (1,259g, 5,62mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(4-(3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)-3-flophenyl)acrylat (raxemat) (850mg, 2,25mmol) và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin (1,467mL, 8,42mmol) trong 1,4-đioxan (5mL). Hỗn hợp này được gia nhiệt ở nhiệt độ 60°C trong 4 giờ, sau đó được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 12 giờ. Hỗn hợp này được phân lớp giữa etyl axetat (25mL) và nước (25mL). Lớp nước được chiết bằng etyl axetat (2 x 25mL) và dịch chiết được kết hợp với lớp hữu cơ. Dịch chiết thu gom được được làm bay hơi trong điều kiện chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, dung môi rửa giải 10% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-methylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang) (600mg, 59,0%). m/z: ES+ [M+H]⁺ 453.

Ví dụ 10: axit (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoic

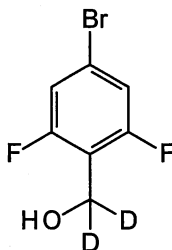


Metyl (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoat (4,70g, 10,27mmol) được hòa tan trong iPrOH (42,8mL) và dung dịch natri hydroxit 5M (6,16mL, 30,82mmol) được bổ

sung vào trong một phần, sau đó phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Nước được bổ sung vào (100mL) và độ pH được điều chỉnh đến pH bằng khoảng 5 bằng HCl 2N. Dung dịch này được chiết bằng EtOAc (x2) và lớp hữu cơ thu gom được được làm khô (MgSO_4) và cô trong điều kiện chân không. Phần cặn được nạp qua đệm silica, rửa giải ban đầu bằng DCM, sau đó lên đến 5% MeOH trong DCM. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi để thu được chất rắn màu vàng (khoảng 4,2g). Phần cặn (4,2g) được hòa tan trong EtOH (20mL) và gia nhiệt đến nhiệt độ 35°C . Nước (30mL) được bổ sung vào từ từ trong khoảng 40 phút. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút nữa, sau đó làm nguội từ từ đến nhiệt độ phòng. Nước (30mL) được bổ sung thêm vào, sau đó phản ứng này được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C . Hỗn hợp này được lọc và chất rắn được rửa bằng nước trước khi làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ 35°C qua đêm để thu được axit (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoic (3,34g, 73,3%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) 1,12 (3H, d), 1,19 (3H, d), 1,26 (3H, d), 2,43 (1H, dd), 2,63 (1H, dd), 2,87 (1H, dd), 3,07 (1H, dd), 3,65 (1H, q), 6,41 (1H, d), 7,02 (2H, d), 7,06 - 7,16 (2H, m), 7,19 - 7,25 (1H, m), 7,41 (1H, s), 7,48 - 7,57 (1H, m), 7,63 (1H, d), CO_2H không quan sát thấy. m/z: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 444.

Hợp chất này có thể có danh pháp khác là axit (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-dihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]acrylic.

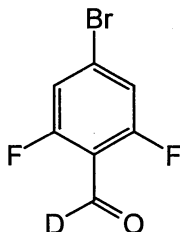
Quy trình điều chế (4-brom-2,6-điflo-phenyl)-điđoteri-metanol



Lithi bođoterua (0,497g, 17,25mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch chứa methyl 4-brom-2,6-điflobenzoate (2,89g, 11,5mmol) trong THF (46,0mL). Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 50°C trong 2 giờ. Sau khi làm nguội, (30mL) HCl 2N được bổ sung từ từ vào. Các lớp được phân tách, và lớp nước được chiết bằng EtOAc (2x50mL).

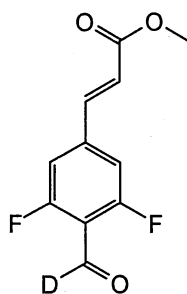
Lớp hữu cơ thu gom được được rửa bằng nước muối, làm khô (MgSO_4) và cô để thu được (4-brom-2,6-điflo-phenyl)-đidoteri-metanol (2,250g, 87%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) 1,96 (1H, s), 7,07 - 7,13 (2H, m).

Quy trình điều chế 4-brom-2,6-điflo-1-đoteribenzaldehyt



Chất phản ứng Dess-Martin (4,98g, 11,73mmol) được bổ sung vào (4-brom-2,6-điflo-phenyl)-đidoteri-metanol (2,20g, 9,78mmol) trong DCM (39,1mL) ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được khuấy trong 1 giờ, sau đó được dừng bằng (50mL) dung dịch natri bicarbonat bão hòa chứa 10% natri thiosulfat. Các pha được phân tách và pha nước được chiết bằng DCM (2x50mL). Pha hữu cơ được làm khô (MgSO_4) và cô, sau đó hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 25% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được 4-brom-2,6-điflo-1-đoteribenzaldehyt (2,040g, 94%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 30°C) 7,18 - 7,25 (2H, m). Không quan sát thấy phổ khối ion.

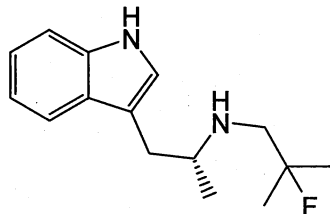
Quy trình điều chế metyl (E)-3-(4-đoteribenzaldehyt-3,5-điflo-phenyl)prop-2-enoat



4-brom-2,6-điflo-1-đoteribenzaldehyt (3,33g, 15,0mmol), trietylamin (4,18mL, 30,00mmol), paladi (II) axetat (0,168g, 0,75mmol) và tritolylphosphin (0,457g, 1,50mmol) được hòa tan trong DMF đã được đuổi khí (36,6mL). Sau đó, metyl acrylat (2,026mL, 22,50mmol) được bổ sung vào và phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong 4 giờ. Sau khi làm nguội, hỗn hợp này được bổ sung vào nước (150mL) và chiết bằng EtOAc (2 x 150mL). Lớp hữu cơ thu gom được được rửa bằng HCl 2N (100mL),

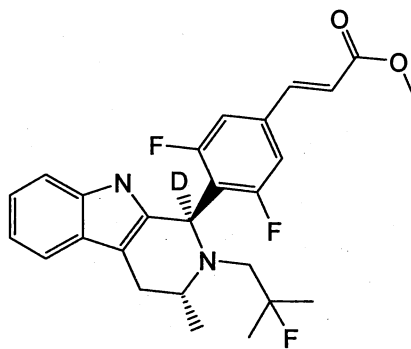
sau đó nước muối (100mL), sau đó làm khô (MgSO₄) và cô. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 40% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được methyl (E)-3-(4-đotericarbonyl-3,5-điflo-phenyl)prop-2-enoat (2,93g, 86%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) 3,83 (3H, d), 6,51 (1H, d), 7,12 (2H, m), 7,57 (1H, d). m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 228.

(R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin



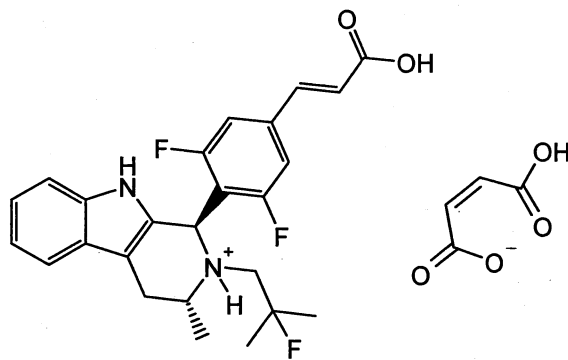
(2R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amin (3,81kg, 21,21mol) được bổ sung vào bình tráng thủy tinh dung tích 100L có vỏ bảo vệ trong điều kiện khí nitơ. 1,4-đioxan (23L) được bổ sung vào, và máy khuấy được bật. Diisopropyletylamin (5,55L; 31,82mol) được bổ sung vào hỗn dịch đã được khuấy, sau đó (2-flo-2-metyl-propyl)triflometansulfonat (5,55kg, 23,77mol). 1,4-đioxan (4L) được bổ sung vào bình này, và hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 75°C. Quá trình gia nhiệt được tiếp tục trong 24 giờ trước khi làm nguội hỗn hợp này đến nhiệt độ 25°C. Nước (30,5L) được bổ sung vào bình này, sau đó bổ sung toluen vào (30,5L). Sau 40 phút máy khuấy được tắt và các lớp được để phân tách. Lớp nước được loại bỏ và nước (30,5L) được bổ sung vào dung dịch hữu cơ. Hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút trước khi phân tách các lớp. Lớp hữu cơ được tách ra khỏi bình phản ứng. Dung dịch hữu cơ được cô bằng cách cất chân không (nhiệt độ vỏ bình 65°C, áp suất 110mbar) cho đến khi 27L dịch cất đã được tách ra. Dung dịch còn lại trong bình phản ứng được làm nguội để thu được (R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-amin dưới dạng dung dịch trong toluen (33% khối lượng/khối lượng) (15,4kg, 97%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,98 (3H, d), 1,26 (3H, d), 1,30 (3H, d), 2,57 - 2,75 (3H, m), 2,81 (1H, dd), 2,84 - 2,92 (1H, m), 6,97 (1H, t), 7,06 (1H, t), 7,11 - 7,22 (1H, nhiều vạch bị che khuất bởi các tín hiệu toluen), 7,34 (1H, d), 7,52 (1H, d), 10,80 (1H, s).

Quy trình điều chế methyl (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoat



(R)-N-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-2-fluoro-2-methylpropan-1-amin [33% khối lượng/khối lượng trong toluen] (11,26g, 14,97mmol) và (E)-3-(4-đotericarbonyl-3,5-điflo-phenyl)prop-2-enoat (3,40g, 14,97mmol) được gia nhiệt trong toluen (55,6mL)/axit axetic (4,28mL, 74,83mmol) ở nhiệt độ 80°C trong 5 giờ. Sau khi làm nguội, các chất bay hơi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Phần cặn được bổ sung vào DCM (200mL) và rửa bằng dung dịch natri bicarbonat bão hòa (200mL). Pha nước được chiết bằng DCM (100mL), sau đó lớp hữu cơ thu gom được được rửa bằng nước muối, làm khô và cô trong điều kiện chân không. Hợp chất thô được nạp vào cột SCX-2, rửa giải bằng metanol để loại bỏ aldehyt không phản ứng. Sau đó, cột này được rửa giải bằng amoniac 7M-MeOH để thu được hợp chất thô. Dịch rửa giải có tính kiềm được làm bay hơi và hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 40% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được methyl (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoat (4,70g, 68,6%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) 1,11 (3H, d), 1,19 (3H, d), 1,25 (3H, d), 2,42 (1H, dd), 2,62 (1H, dd), 2,87 (1H, dd), 3,07 (1H, dd), 3,65 (1H, q), 3,81 (3H, s), 6,39 (1H, d), 6,99 (2H, d), 7,06 - 7,17 (2H, m), 7,23 (1H, dd), 7,45 (1H, s), 7,49 - 7,6 (2H, m). m/z: ES⁺ [M+H]⁺ 458.

Ví dụ 11: Quy trình điều chế (1R,3R)-1-{4-[(E)-2-carboxyetenyl]-2,6-điflophenyl}-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-beta-carbolin-2-ium maleat



Dung dịch chứa axit maleic (1,31g, 11,29mmol) trong axeton (15mL) được khuấy trong điều kiện khí nitơ. Dung dịch chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (ví dụ 1) (5,00g, 11,3mmol) trong axeton (25mL) được bổ sung vào dung dịch axit maleic này để thu được dung dịch màu vàng. Bình phản ứng được bọc trong giấy bạc để tránh ánh sáng và sục dòng khí nitơ qua đêm cho đến khi dung môi bay hơi hết. Chất rắn thu được được làm khô trong điều kiện chân không trong 2 giờ để thu được hợp chất mong muốn dưới dạng chất rắn màu kem (6,23g, 98%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,95 - 1,34 (9H, m), 2,24 - 2,45 (1H, m), 2,54 - 2,66 (1H, m), 2,8 - 2,99 (2H, m), 3,52 (1H, s), 5,22 (1H, s), 6,26 (2H, s), 6,67 (1H, d), 6,89 - 7,07 (2H, m), 7,19 (1H, d), 7,39 - 7,51 (3H, m), 7,55 (1H, d), 10,59 (1H, s).

Mẫu nhiễu xạ bột tia X của muối maleat này được thể hiện trên Fig.8 và kết quả đo nhiệt lượng quét vi sai được thể hiện trên Fig.9.

Ví dụ 12

Dược phẩm chứa hợp chất theo ví dụ 1 được bào chế ở lượng bằng 75g bằng quy trình tạo hạt ướt. Hoạt chất, manitol, xenluloza vi tinh thể và natri tinh bột glycolat được cân với lượng được thể hiện trong bảng dưới đây và chuyển vào máy tạo hạt kết hợp trộn Diosna P1-6 và trộn (kết hợp nghiền) ở tốc độ bằng 600 vòng/phút trong 6 phút. Đối với dược phẩm A, quá trình trộn được tiếp tục đồng thời 30mL nước được bổ sung hai lần vào ở tốc độ bằng khoảng 1mL/giây, tạm dừng trộn giữa hai lần bổ sung, trong khi đó đối với dược phẩm B, dung dịch được điều chế bằng cách khuấy lượng cần thiết của EDTA và axit ascorbic với 20mL nước ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút (bảo vệ tránh ánh sáng) được bổ sung vào bằng quy trình tương tự, trong trường hợp này dung dịch thứ hai được bổ sung vào chứa khoảng 10mL dịch rửa. Quá trình trộn ướt được tiếp tục trong tổng cộng 1,5 phút. Các hạt ướt được rây qua rây có kích cỡ mắt rây bằng 1,5mm, sau đó làm

khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C đến hàm lượng ẩm nhỏ hơn 2% khối lượng/khối lượng. Các hạt thu được được nghiền bằng rây có kích cỡ mắt rây bằng 1mm, sau đó trộn với tá dược tron trong 5 phút ở tốc độ bằng 32 vòng/phút bằng máy trộn Turbula. Viên nén chứa 10mg hoạt chất được bào chế bằng cách dập các hạt này đến khối lượng dập tiêu chuẩn bằng 100mg bằng máy dập viên Riva Mini được trang bị cối tiêu chuẩn có đường kính bằng 6mm.

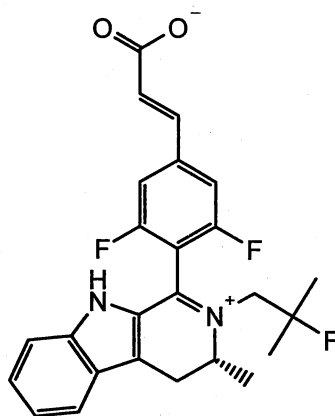
Thành phần	Vai trò	Dược phẩm A		Dược phẩm B	
		% khối lượng/khối lượng	Lượng (g)	% khối lượng/khối lượng	Lượng (g)
Dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1	Hoạt chất	10,0	7,50	10,0	7,50
EDTA	Chất tạo phức chelat	Không có mặt		0,1	0,075
Axit ascorbic	Chất chống oxy hóa	Không có mặt		0,5	0,375
Manitol	Tá dược pha loãng	68,0	51,00	67,4	50,55
Xenluloza vi tinh thể	Tá dược pha loãng	15,0	11,25	15,0	11,25
Natri tinh bột glycolat	Tá dược rã	5,0	3,75	5,0	3,75
Axit stearic	Tá dược tron	2,0	1,50	2,0	1,50
Tổng cộng		100	75,00	100	75,00

Độ ổn định của dược phẩm A và dược phẩm B theo tiêu chuẩn hình thành sản phẩm phân hủy (trong đó “sản phẩm phân hủy” là (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat) được đánh giá đối với viên nén được đóng gói trong lọ HDPE hàn kín có dung tích bằng 75mL hoặc tiếp xúc với không khí trên đĩa petri, bảo quản trong bóng tối, trong điều kiện có kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm như được thể hiện trong bảng dưới đây. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy dược phẩm B, mà chứa cả chất tạo phức chelat lẫn chất chống oxy hóa có độ ổn định hóa học cao hơn dược phẩm A - là viên nén quy ước.

Độ ổn định của dược phẩm theo tiêu chuẩn hình thành sản phẩm phân hủy (%).

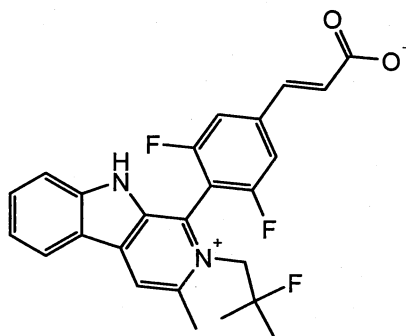
Dược phẩm	Thời gian ban đầu	Sau 4 tuần (điều kiện bảo quản)			
		(5°C, đóng gói trong lọ HDPE)	(25°C/độ ẩm tương đối 60%, đóng gói trong lọ HDPE)	(25°C/độ ẩm tương đối 60%, tiếp xúc với không khí)	(40°C/độ ẩm tương đối 75%, tiếp xúc với không khí)
Dược phẩm A	0,05	0,06	0,08	0,27	0,28
Dược phẩm B	ND	<0,05	<0,05	0,05	0,11
ND: Không phát hiện được (<0,02% khối lượng/khối lượng)					

Ví dụ 13: (E)-3-[3,5-điflo-4-[(3R)-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl]phenyl]prop-2-enoat



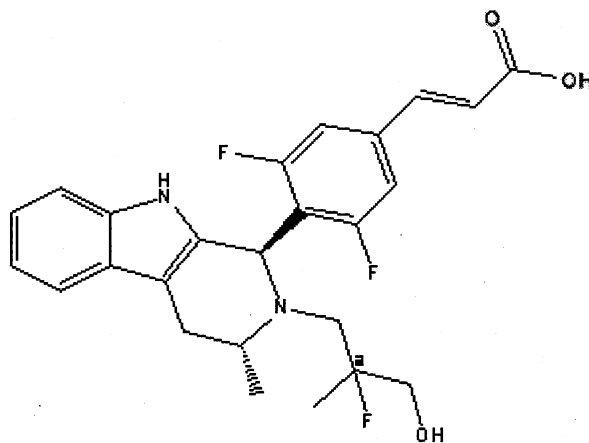
Axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (200mg, 0,45mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa xeri amoni nitrat (248mg, 0,45mmol) trong axetonitril (6mL)/nước (1,500mL) ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được khuấy trong 2 giờ và xeri amoni nitrat (248mg, 0,45mmol) được bổ sung thêm vào. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 15 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng được axit hóa bằng HCl 2M (3mL) và chiết bằng DCM (2x10mL). Sau đó, pha hữu cơ được cô trong điều kiện chân không và hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Waters SunFire, silica 5µm, đường kính 50mm, chiều dài 100mm), bằng dung môi rửa giải là dung dịch nước phân cực giảm dần chứa 0,1% axit formic và MeCN. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat (35,0mg, 17,58%) dưới dạng thủy tinh màu cam. ¹H NMR (500 MHz, DMSO, 30°C) 1,27 (3H, d), 1,43 - 1,55 (6H, m), 3,51 (1H, d), 3,72 (1H, dd), 3,96 (1H, dd), 4,18 - 4,32 (1H, m), 4,67 (1H, s), 6,59 (1H, s), 7,09 - 7,3 (2H, m), 7,42 (1H, t), 7,52 - 7,73 (3H, m), 7,78 (1H, d), NH không quan sát thấy. HRMS (ESI): [M+H]⁺, định lượng 441,17831, C₂₃H₂₄F₂N₂O₂ lý thuyết 441,17844.

Quy trình điều chế (E)-3-[3,5-điflo-4-[2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-9H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl]phenyl]prop-2-enoat



Axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic (0,500g, 1,13mmol) được hòa tan trong DMSO (10mL) và gia nhiệt đến nhiệt độ 120°C trong không khí và điều kiện ánh sáng trong 16 giờ. Sau đó phản ứng này được gia nhiệt đến nhiệt độ 180°C trong 2,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, silica 5μm, đường kính 50mm, chiều dài 100mm), bằng dung môi rửa giải là dung dịch nước phân cực giảm dần chứa 1% amoniac và MeCN. Các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-3-[3,5-điflo-4-[2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-9H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl]phenyl]prop-2-enoat (0,047g, 9,40%) dưới dạng dầu màu cam. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) 1,27 (3H, s), 1,33 (3H, d), 3,09 (3H, s), 4,59 - 4,8 (1H, m), 5,14 - 5,37 (1H, m), 6,54 (1H, d), 7,19 (1H, d), 7,39 (1H, t), 7,63 (2H, d), 7,74 (1H, t), 7,91 (1H, d), 8,45 (1H, d), 8,88 (1H, s), 10,79 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]⁺ 439.

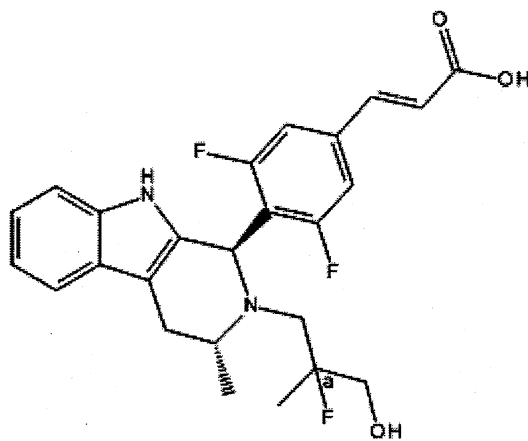
Ví dụ 14A: Quy trình điều chế axit (E)-3-[3,5-điflo-4-[(1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metyl-propyl)-3-metyl-1,3,4,9-tetrahydropyrido[3,4-b]indol-1-yl]phenyl]prop-2-enoic (chất đồng phân 1)



a = cấu hình tuyệt đối chưa biết
Chất đồng phân 1

Dung dịch natri hydroxit 2M (1,27mL, 2,54mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat - Chất đồng phân 1 (120mg, 0,25mmol) trong THF (0,635mL)/metanol (0,635mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, sau đó pha loãng bằng EtOAc và nước. Pha nước được điều chỉnh đến độ pH = 6 bằng HCl 2M, và các lớp được phân tách. Lớp nước được chiết bằng EtOAc, sau đó lớp hữu cơ thu gom được được làm khô (MgSO₄) và cô trong điều kiện chân không. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradient rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% MeOH trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic - Chất đồng phân 1 (85mg, 72,9%) dưới dạng chất rắn màu be. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) 0,97 (3H, d), 1,05 (3H, d), 2,32 - 2,4 (1H, m), 2,44 - 2,54 (1H, m), 2,73 - 2,93 (3H, m), 3 - 3,14 (2H, m), 3,32 - 3,49 (2H, m), 4,73 (1H, s), 5,14 (1H, s), 6,58 (1H, d), 6,82 - 6,96 (2H, m), 7,10 (1H, d), 7,33 (1H, d), 7,36 (1H, d), 7,45 (1H, d), 10,49 (1H, s). m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 459.

Ví dụ 14B: Quy trình điều chế axit (E)-3-[3,5-điflo-4-[(1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metyl-propyl)-3-metyl-1,3,4,9-tetrahydropyrido[3,4-b]indol-1-yl]phenyl]prop-2-enoic (chất đồng phân 2)

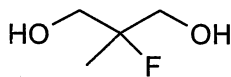


a = cấu hình tuyệt đối chưa biết
Chất đồng phân 2

Dung dịch natri hydroxit 2M (1,27mL, 2,54mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (E)-methyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat - Chất đồng phân 2 (110mg, 0,23mmol) trong THF (0,529mL)/metanol (0,529mL). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, sau đó pha loãng bằng EtOAc và nước. Pha nước được điều chỉnh đến độ pH = 6 bằng HCl 2M, và các lớp được phân tách. Lớp nước được chiết bằng EtOAc, sau đó lớp hữu cơ thu gom được được làm khô (MgSO₄) và cô trong điều kiện chân không. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% MeOH trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic - Chất đồng phân 2 (81mg, 76%) dưới dạng chất rắn màu be. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) 1,02 (2H, s), 1,05 (3H, d), 1,23 (1H, s), 1,90 (3H, s), 2,28 - 2,46 (1H, m), 2,53 - 2,7 (1H, m), 2,86 - 3,03 (2H, m), 3,56 (1H, d), 4,83 (1H, s), 5,17 (1H, s), 6,66 (1H, d), 6,86 - 7,08 (2H, m), 7,17 (1H, d), 7,40 (1H, d), 7,44 (2H, d), 7,53 (1H, d), 10,54 (1H, s). m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 459.

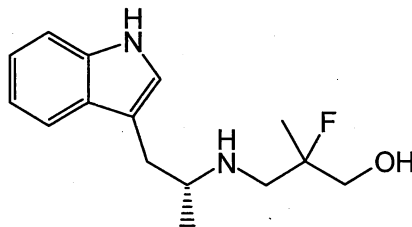
(E)-methyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-3-hydroxy-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1 và chất đồng phân 2) được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu được điều chế như sau:

2-flo-2-metylpropan-1,3-điol



LiAlH₄ (0,741g, 19,25mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch đã làm lạnh chứa diethyl 2-fluoro-2-methylmalonate (1,345g, 7,00mmol) trong THF (35,0mL). Phản ứng được để ấm đến nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ 0°C, phản ứng được dừng bằng nước (0,75mL), NaOH 15% (0,75mL), sau đó nước (1,5mL). Hỗn dịch này được khuấy trong 30 phút, sau đó lọc và chất rắn được rửa bằng THF. Dịch lọc được làm bay hơi để thu được 2-fluoro-2-methylpropan-1,3-diol (0,745g, 98%) dưới dạng dầu không màu. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C) 1,34 (3H, d), 2,12 - 2,27 (2H, m), 3,75 (4H, d).

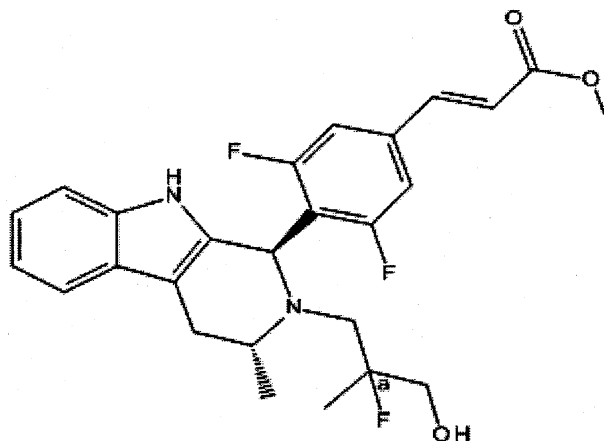
3-(((R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-2-fluoro-2-methylpropan-1-ol



Triflometansulfonic anhydrit (1,151mL, 6,80mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 2-fluoro-2-methylpropan-1,3-diol (0,70g, 6,47mmol) trong DCM (17,85mL) ở nhiệt độ 0°C, sau đó 2,6-lutidin (0,908mL, 7,77mmol). Phản ứng được để ấm đến nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó được rửa bằng HCl 2M. Pha hữu cơ được nạp qua cột phân tách pha và cô trong điều kiện chân không. Phần cặn được hòa tan trong đioxan (12mL), sau đó (R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amin (1,128g, 6,47mmol) và DIPEA (1,678mL, 9,71mmol) được bổ sung vào và phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 90 °C trong 2 h. Sau khi làm nguội, phản ứng được pha loãng với DCM và rửa bằng nước. Lớp nước được chiết bằng DCM, sau đó pha hữu cơ được cô trong điều kiện chân không. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradient rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 10% MeOH trong DCM. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được 3-(((R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-2-fluoro-2-methylpropan-1-ol (0,815g, 47,6%) dưới dạng chất gồm màu nâu. m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 265.

(E)-methyl 3-(3,5-difluoro-4-(((1R,3R)-2-(2-fluoro-3-hydroxy-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1 và chất đồng phân 2)

Chất đồng phân đối ảnh AND

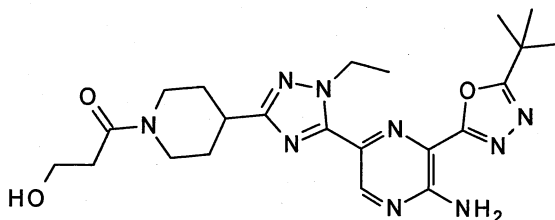


a = cấu hình tuyệt đối chưa biết
 Chất đồng phân 1 và chất đồng phân 2

(E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-formylphenyl)acrylat (565mg, 2,50mmol) được bổ sung vào hỗn dịch chứa 3-(((R)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)amino)-2-fluoro-2-methylpropan-1-ol (661mg, 2,50mmol) trong toluen (11,3mL)/axit axetic (1,25mL). Phản ứng được gia nhiệt đến nhiệt độ 90°C trong 5 giờ. Sau khi làm nguội, các chất bay hơi được loại bỏ trong điều kiện chân không, sau đó phần cặn được nạp qua cột SCX-2, rửa giải bằng metanol để loại bỏ aldehyt không phản ứng. Sau đó, cột này được rửa giải bằng NH₃/MeOH để thu được hợp chất thô. Dịch rửa giải có tính kiềm được làm bay hơi, sau đó hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 0% đến 50% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-3-hydroxy-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 1 - 122mg, 10,3%) dưới dạng chất rắn màu vàng và (E)-metyl 3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-3-hydroxy-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylat (chất đồng phân 2 - 129mg, 11% dưới dạng chất rắn màu vàng cam. Chất đồng phân 1 - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C) 1,10 (3H, d), 1,14 (3H, d), 2,54 (1H, dd), 2,62 - 2,73 (1H, m), 3,06 - 3,3 (2H, m), 3,40 (1H, dd), 3,56 (1H, t), 3,80 (3H, s), 3,87 - 4,08 (1H, m), 4,27 (1H, s), 5,16 (1H, s), 6,37 (1H, d), 7,01 (2H, d), 7,07 - 7,15 (2H, m), 7,14 - 7,24 (1H, m), 7,42 - 7,56 (2H, m), 7,71 (1H, s). m/z (ES⁺), [M+H]⁺ = 473. Chất đồng phân 2 - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C) 1,15 (3H, d), 1,20 (3H, d), 2,65 (1H, dd), 2,79 (1H, t), 2,93 - 3,09 (2H, m), 3,57 (1H, dt), 3,70 (1H, dd), 3,78 (3H, s), 4,2 - 4,67 (1H, m), 5,42 (1H, s), 6,32 (1H, d), 6,94 (2H, d), 7,06 - 7,15

(2H, m), 7,19 - 7,27 (2H, m), 7,42 (1H, s), 7,51 (1H, dd), 8,02 (1H, s). m/z (ES^+), $[M+H]^+ = 473$.

Ví dụ đối chiếu 1: 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on



Pyridin 4-metylbenzensulfonat (11,62g, 46,24mmol) được bổ sung vào hỗn dịch chứa 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propan-1-on (128g, 231,19mmol) trong metanol (1L) trong điều kiện khí nitơ. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 1,5 giờ. Hỗn hợp này hòa tan sau 5 phút. Hỗn hợp này được giữ ở nhiệt độ 50°C qua đêm trong thời gian này kết tủa được tạo ra. Lọc thu lấy chất rắn này và rửa bằng nước và axetonitril. Hợp chất này vẫn chứa lượng nhỏ tạp chất từ công đoạn trước và cần tinh chế thêm. Hợp chất này được hòa tan trong diclometan và tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh trên silica gel (0% metanol/DCM đến 10% metanol/DCM) để thu được hợp chất mong muốn, 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (Ví dụ đối chiếu 1) (92g, 85%) dưới dạng chất rắn màu kem (Dạng A): 1H NMR: (DMSO- d_6) 1,4 - 1,51 (12H, m), 1,51 - 1,78 (2H, m), 1,89 - 2,05 (2H, m), 2,72 - 2,86 (1H, m), 2,91 - 3,05 (1H, m), 3,12 - 3,24 (1H, m), 3,64 (2H, q), 3,83 - 4,01 (1H, m), 4,29 - 4,41 (1H, m), 4,47 (1H, t), 4,58 (2H, q), 8,26 (2H, s), 8,85 (1H, s); $[M+H]^+ = 470$.

1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propan-1-on được điều chế như sau:

1,8-điazabixyclo[5,4,0]undec-7-en (76mL, 511,14mmol) được bổ sung vào hỗn dịch chứa tert-butyl 4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-carboxylat (150g, 319,46mmol) trong 2-metylTHF (1,2L). Iotetan (46mL, 575,03mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ 35°C. Iotetan (46mL, 575,03mmol) và 1,8-điazabixyclo[5,4,0]undec-7-en

(76mL, 511,14mmol) được bổ sung thêm vào và tiếp tục khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ 35°C. Hỗn hợp này được rót vào nước và lọc thu lấy chất rắn không tan, rửa bằng nước và MTBE và làm khô trong điều kiện chân không để thu được tert-butyl 4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-carboxylat (116g, 73,0%) dưới dạng chất rắn màu vàng. Dịch lọc được chiết bằng DCM và dung dịch hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh trên silica bằng gradien rửa giải (30% MTBE/heptan đến 100% MTBE) để thu được mẻ hợp chất mong muốn thứ hai (12g, 24,12mmol, 7,55%) dưới dạng chất rắn màu vàng, sau đó trộn với mẻ hợp chất mong muốn thứ nhất: ^1H NMR: (DMSO- d_6) 1,41 (9H, s), 1,44 (9H, s), 1,48 (3H, t), 1,52 - 1,69 (2H, m), 1,87 - 2,04 (2H, m), 2,79 - 3,03 (3H, m), 3,86 - 4,03 (2H, m), 4,59 (2H, q), 7,89 (2H, s), 8,85 (1H, s); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 498$.

Hỗn dịch chứa tert-butyl 4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-carboxylat (3009,5g, 6,05mol) trong DCM (9L) được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 10°C trong điều kiện khí nitơ. TFA (9L) được bổ sung từng giọt vào hỗn dịch này đồng thời duy trì nhiệt độ nhỏ hơn 30°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp này được cô, phần cặn thu được được hòa tan trong nước (30L) và bổ sung từ từ vào dung dịch nước amoniac 35% (12L) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Hỗn dịch này được khuấy trong 30 phút, sau đó hợp chất được lọc ra và rửa bằng nước (2 x 6L). Hợp chất này được làm khô ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện chân không trong 2 ngày để thu được 3-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-5-(1-ethyl-3-(piperidin-4-yl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)pyrazin-2-amin ((2496g): ^1H NMR: (DMSO- d_6) 1,4 - 1,52 (12H, m), 1,57 - 1,73 (2H, m), 1,83 - 1,93 (2H, m), 2,57 - 2,7 (2H, m), 2,71 - 2,84 (1H, m), 2,96 - 3,09 (2H, m), 4,58 (2H, q), 8,06 (2H, s), 8,84 (1H, s); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 398$.

Bổ sung từng giọt O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat (115,73g, 0,3051mol) vào dung dịch chứa axit 3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy) propanoic (HATU, 48,80 g 0,2774mol) và N-ethyl-N-isopropylpropan-2-amin (86,96mL, 0,4993mol) trong THF (552mL) ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khí nitơ. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 20 phút, sau đó 3-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-5-(1-ethyl-3-(piperidin-4-yl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)pyrazin-2-amin (122,5 g (110,25g hoạt chất), 0,2774mol) được bổ sung từng giọt vào trong 1 giờ. Sau 3,5 giờ, hỗn hợp này

được cô và phần cần được tạo hỗn dịch đặc trong MeCN (275mL) trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Hợp chất được lọc ra, rửa bằng MeCN (3 x 110mL) và làm khô qua đêm ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện chân không để thu được 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propan-1-on (131,9g, 96%). ^1H NMR: (DMSO- d_6) 1,29 - 1,48 (16H, m), 1,48 - 1,75 (4H, m), 1,83 - 1,99 (2H, m), 2,48 - 2,68 (2H, m), 2,68 - 2,79 (1H, m), 2,87 - 2,99 (1H, m), 3,07 - 3,19 (1H, m), 3,32 - 3,42 (1H, m), 3,47 - 3,6 (1H, m), 3,64 - 3,75 (1H, m), 3,75 - 3,84 (1H, m), 3,84 - 3,95 (1H, m), 4,24 - 4,39 (1H, m), 4,47 - 4,6 (3H, m), 7,84 (2H, s), 8,79 (1H, s): $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 577$.

Quy trình khác để điều chế hợp chất theo ví dụ đối chiếu 1

Bổ sung pyridin p-toluensulfonat (11,97g, 47,7mmol) vào hỗn dịch chứa 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propan-1-on (131,9g, 0,2382mol) trong metanol (1045mL) trong điều kiện khí nitơ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 5,5 giờ, sau đó ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và chất rắn được lọc ra. Hợp chất này được tạo hỗn dịch đặc trong nước (250mL) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, lọc ra, rửa bằng nước (3x40mL) và làm khô ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện chân không để thu được 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (21,4g) dưới dạng tinh thể A.

Dung dịch metanol nêu trên được cô và chất rắn thu được được tạo hỗn dịch đặc trong nước (0,6L) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Lọc phân tách chất rắn và rửa bằng nước (3x100mL). Bánh lọc được tạo hỗn dịch đặc lần thứ hai trong nước (0,5L) thêm 20 phút. Lọc thu lấy hợp chất này, rửa bằng nước (100mL) và làm khô ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện chân không để thu được 81,9 g 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (81,9g) dưới dạng tinh thể A.

Cả hai mẻ được thu gom (103,3g), tạo mầm bằng dạng tinh thể B (16,68g) và tạo hỗn dịch đặc trong MeCN (826mL) ở nhiệt độ phòng qua đêm để thu được 117,4 g of 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (117,4g),

Dạng B. Hợp chất này tiếp tục được tinh chế bằng cách tạo hỗn dịch đặc trong heptan (7,5 phần thể tích) trong 1 giờ. Hỗn hợp này được lọc, hút khô trên màng lọc, và làm khô ở nhiệt độ 50°C trong lò chân không qua đêm để thu được 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (102,5g) dưới dạng tinh thể B.

Dạng tinh thể B cũng có thể được điều chế bằng cách tạo hỗn dịch đặc dạng tinh thể A trong MeCN mà không cần tạo mầm.

Dạng tinh thể A hoặc dạng tinh thể B cũng có thể được biến đổi thành dạng tinh thể C như sau:

Hỗn dịch chứa 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on (ví dụ dạng tinh thể B được điều chế bằng quy trình nêu trên) trong IPA (12 phần thể tích) được gia nhiệt ở nhiệt độ hồi lưu cho đến khi chất rắn hòa tan. Dung dịch này được lọc nóng, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng để thu được 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-ethyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-yl)-3-hydroxypropan-1-on dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (99,3g, 97%) dưới dạng tinh thể C.

Dạng tinh thể C cũng có thể được biến đổi thành dạng tinh thể B như sau:

Trong bình phản ứng dung tích 10L, dạng tinh thể C (377,8g, phần 1) trong MIBK (7900mL) được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 110°C đến 115°C để thu được dung dịch. Dung dịch này được để nguội đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 97°C đến 103°C và lọc trong ngay vào bình dung tích 50L chứa hạt dạng tinh thể B (0,8g) trong axetonitril (8220mL) kết hợp khuấy ở nhiệt độ -15°C. Trong quá trình bổ sung, nhiệt độ trong bình dung tích 50L được duy trì nằm trong khoảng từ -15°C và 25°C bằng cách làm lạnh vỏ vình. Ba phần hợp chất ở dạng tinh thể C được hòa tan trong MIBK được bổ sung thêm vào bằng cùng phương pháp. Bổ sung hạt dạng tinh thể B (0,8g) vào hỗn dịch đặc thu được, sau đó hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 20°C qua đêm. Kết quả phân tích trong quy trình điều chế cho thấy dạng tinh thể mong muốn B được tạo ra và không quan sát thấy dạng tinh thể C hoặc dạng vô định hình. Hỗn hợp này được lọc và rửa bằng axetonitril (3340mL). Chất rắn này được làm khô trong lò trong 2 ngày (chất rắn bị phá vỡ trong quá trình làm khô để thu được bột và

hỗn hợp các hạt nhỏ có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1mm đến 3-4mm) đến khối lượng không đổi. Hiệu suất = 1532,8 g (93,5%)

Axit 3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoic được điều chế như sau:

Bổ sung từng giọt beta-propiolacton (175mL, 2,78mol) vào dung dịch được khuấy chứa metanol (2,4L) và axit sulfuric đặc (44,4mL, 832,61mmol) ở nhiệt độ 0°C trong điều kiện khí nitơ. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến 10°C trước khi bổ sung từng giọt natri bicarbonat vào (145g, 1,72mol), hỗn dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 75 phút. Dung dịch này được lọc, bánh lọc được rửa bằng metanol (800mL). Dịch lọc được làm bay hơi để thu được dầu, sau đó được hòa tan lại trong điclorometan (1,2L) và khuấy trong 60 phút trước khi lọc lại. Dung dịch này được lọc trước khi làm bay hơi để thu được methyl 3-hydroxypropanoat (219g, 76%) dưới dạng dầu. ^1H NMR: (CDCl_3) 2,50 (2H, t), 3,63 (3H, s), 3,78 (2H, t).

Pyridin p-toluensulfonat (7,65g, 30,45mmol) được bổ sung vào dung dịch trong suốt chứa methyl 3-hydroxypropanoat (63,4g, 609,00mmol) và 3,4-dihydro-2H-pyran (78mL, 852,60mmol) trong điclorometan (650mL) ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khí nitơ để thu được dung dịch đục. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng nước (250mL) và nước muối (250mL) trước khi làm khô (MgSO_4) và làm bay hơi để thu được dầu. Hợp chất thô này được tinh chế bằng phương pháp sắc ký silica nhanh, gradien rửa giải nằm trong khoảng từ 15% đến 30% EtOAc trong heptan. Các phân đoạn tinh khiết được làm bay hơi đến khô để thu được methyl 3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoat (67,7g, 59,0%) dưới dạng dầu không màu: ^1H NMR: (CDCl_3) 1,47 (4H, dddd), 1,55 - 1,84 (2H, m), 2,55 (2H, t), 3,33 - 3,53 (1H, m), 3,53 - 3,7 (4H, m), 3,78 (1H, ddd), 3,93 (1H, dt), 4,42 - 4,72 (1H, m); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 189$.

Natri hydroxit (2M, 349mL, 697,58mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa methyl 3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoat (67,68g, 359,58mmol) trong THF (680mL) ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. THF được loại bỏ trong điều kiện chân không, sau đó pha nước được rửa bằng etyl axetat (260mL), trước khi làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và axit hóa từ từ đến độ pH = 5 bằng axit hydrocloric (2M). Hợp chất được chiết bằng etyl axetat (3 x 250mL) trước khi làm khô

(MgSO₄) và làm bay hơi để thu được axit 3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoic (57,0g, 91%) dưới dạng dầu trong suốt. Hợp chất này được hòa tan trong etyl axetat (750mL), sau đó rửa bằng nước (3 x 250mL) và nước muối (250mL) để loại bỏ axit axetic còn dư. Dung dịch hữu cơ được làm khô (MgSO₄) và làm bay hơi để thu được axit 3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoic (45,67g, 72,9%) dưới dạng dầu không màu: ¹H NMR: ¹H NMR (CDCl₃) 1,43 - 1,67 (4H, m), 1,65 - 1,95 (2H, m), 2,68 (2H, t), 3,48 - 3,58 (1H, m), 3,73 (1H, dt), 3,88 (1H, ddd), 4,02 (1H, dt), 4,59 - 4,7 (1H, m); [M-H]⁻ = 173.

tert-butyl 4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-carboxylat được điều chế như sau:

Hydrazin hydrat (23,59mL, 480,75mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp được khuấy chứa methyl 3-amino-6-brompyrazin-2-carboxylat (100g, 418,04mmol) trong EtOH (2L). Hỗn hợp này được gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện khí nitơ. Hỗn dịch đặc thu được được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 16 giờ. Hydrazin (2,5mL) được bổ sung thêm vào và hỗn dịch này được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ nữa. Etanol (500mL) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng đặc và hỗn hợp này được để nguội đến nhiệt độ phòng. Hỗn dịch thu được được lọc và chất rắn rửa bằng etanol (1L) và làm khô trong điều kiện chân không để thu được 3-amino-6-brompyrazin-2-carbohydrazit (98g, định lượng) dưới dạng chất rắn màu kem: ¹H NMR; (DMSO-d₆) 4,52 (2H, s), 7,59 (2H, s), 8,30 (1H, s), 9,74 (1H, s); [M+H]⁺ = 232.

Pivalic anhydrit (165mL, 815,38mmol) được bổ sung vào hỗn hợp được khuấy chứa 3-amino-6-brompyrazin-2-carbohydrazit (172g, 741,26mmol) trong axetonitril (1,8L) và hỗn hợp này được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 1 giờ. Phản ứng được khuấy trong 16 giờ. Lọc thu lấy chất rắn màu vàng mong muốn. Dịch lọc được phân lớp giữa EtOAc (2L) và dung dịch nước natri bicarbonat (2L). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối bão hòa và làm khô bằng MgSO₄. Dung dịch này được lọc và cô để thu được chất rắn dính màu vàng được nghiền với MTBE (250mL). Lọc thu lấy chất rắn màu vàng không tan và hợp chất này là giống như chất rắn thu được ở mẻ thứ nhất. Các chất rắn thu gom được được làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ 50°C trong 3 ngày để thu được 3-amino-6-brom-N'-pivaloylpyrazin-2-carbohydrazit (224g, 96%) dưới dạng chất rắn màu vàng: ¹H NMR: (DMSO-d₆) 1,17 (9H, s), 7,62 (2H, s), 8,37 (1H, s), 9,42 - 9,56 (1H,

m), 10,09 - 10,23 (1H, m); $[M+H]^+ = 318$.

Bổ sung từng giọt DIPEA (3,044L; 17,48mol) và *p*-toluensulfonyl clorua (1665g, 8,73mol) (khoảng 280g x 6) vào 3-amino-6-brom-N'-pivaloylpyrazin-2-carbohydrazit (2301g, 7,28mol) trong MeCN (10,8L) ở nhiệt độ 50°C trong 30 phút. Nhiệt độ phản ứng được duy trì nằm trong khoảng từ 65°C đến 70°C bằng cách kiểm soát tốc độ bổ sung. Sau khi bổ sung hoàn toàn, hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 70°C trong 1 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ phòng và dừng bằng dung dịch nước NaHCO₃ 5% (24,2L). Hỗn dịch thu được được khuấy trong 30 phút, sau đó lọc. Hợp chất được rửa bằng nước (14,8L), hút khô và làm khô ở nhiệt độ 50°C trong 16 giờ. Hợp chất được hòa tan trong DCM (12L) và các pha được phân tách. Pha hữu cơ được nạp vào cột silica (6kg) và hợp chất được rửa giải bằng 20% EtOAc/DCM (8 x 10L). Tinh chế các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn bằng HPLC để thu được 1987g 5-brom-3-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-amin (hiệu suất 92%) với độ tinh khiết bằng 99,8% (36g, 17%): ¹H NMR: (DMSO-d₆) 1,43 (9H, s), 7,70 (2H, s), 8,39 (1H, s); $[M+H]^+ = 298$.

Dòng khí nitơ được sục vào dung dịch chứa 5-brom-3-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-amin (89,35g, 239,75mmol) trong DMA (1,2L) trong 20 phút. Dixyclohexyl(2',4',6'-triisopropylbiphenyl-2-yl)phosphin (11,43g, 23,98mmol), tris(dibenzylidenaxeton)đipaladi(0) (5,49g, 5,99mmol), kẽm (1,568g, 23,98mmol) và kẽm đixyano (16,89g, 143,85mmol) được bổ sung lần lượt vào hỗn hợp đã được khuấy. Hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 100°C và khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội và phân lớp giữa DCM (3L) và nước (1L). Hỗn hợp màu đen được lọc qua đệm xelit và lớp hữu cơ được phân tách. Dung dịch này được rửa bằng nước, sau đó bằng nước muối. Dung dịch này được làm khô bằng magie sulfat và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được nghiền với MTBE và lọc, rửa bằng MTBE. Bánh lọc được làm khô trong điều kiện chân không để thu được 5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-carbonitril (55,7g, 95%) dưới dạng dầu màu cam nhạt: ¹H NMR: (DMSO-d₆) 1,46 (9H, s), 6,02 (1H, s), 8,38 (2H, s); $[M-H]^- = 242$.

Hydrazin hydrat (82mL, 1,69mol) được bổ sung vào 5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-carbonitril (55g, 225,18mmol) trong IPA (200mL) và hỗn hợp này được gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện khí nitơ trong 16 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội trong bể nước đá. Lọc thu lấy chất kết tủa mong muốn, rửa bằng IPA và dietyl ete và làm khô đến khối lượng không đổi để thu được (Z)-5-amino-6-(5-tert-

butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-carbohydrazonamit (49,2g, 79%) dưới dạng chất rắn màu vàng: $^1\text{H NMR}$: ($\text{DMSO}-d_6$) 1,45 (9H, s), 5,26 (2H, s), 5,58 (2H, s), 7,56 (2H, s), 8,75 (1H, s); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 277$.

O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflorophosphat (74,3g, 195,44mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit N-Boc-isonipecotic (41,1g, 179,15mmol) và 4-metylmorpholin (35,9mL, 325,74mmol) trong DMA (800mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút, sau đó (Z)-5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-carbohydrazonamit (45g, 162,87mmol) được bổ sung vào dung dịch này trong một phần (quan sát thấy nhiệt tỏa ra từ 22°C đến 27°C). Sau vài phút, hợp chất được kết tinh từ hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được loại bỏ khỏi bình phản ứng và lọc qua máy lắng. DMA được bổ sung thêm vào để rửa hợp chất từ phía các thành bình phản ứng (150mL) và dung dịch này được rót vào bánh lọc. Isopropanol (600mL) được bổ sung vào bình này và hợp chất còn dư trong bình phản ứng được tạo hỗn dịch trong dung môi này bằng cách khuấy mạnh. Hỗn dịch isopropanol này được sử dụng để rửa lạnh lọc ngay khi DMA đã được hút ra. Bánh lọc được hút khô, sau đó rửa bằng MTBE và hút khô một lần nữa. Bánh lọc được làm khô trong điều kiện chân không để thu được (Z)-tert-butyl 4-(2-(amino(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)metylen)hydrazincarbonyl)piperidin-1-carboxylat (76g, 95%) dưới dạng chất rắn màu vàng: $^1\text{H NMR}$: ($\text{DMSO}-d_6$) 1,40 (9H, s), 1,46 (9H, s), 1,63 - 1,9 (2H, m), 2,33 - 2,6 (2H, m, bị che khuất bởi tín hiệu DMSO), 2,63 - 3,03 (2H, m), 3,18 - 3,48 (4H, m, bị che khuất bởi tín hiệu nước), 3,88 - 4,11 (2H, m), 6,43 (2H, s), 7,76 (2H, br), 8,84 (0,5H, s), 8,87 (0,5H, s), 9,85 (1H, s); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 488$

Theo cách khác, axit N-Boc-isonipecotic có thể được điều chế tại chỗ như sau:

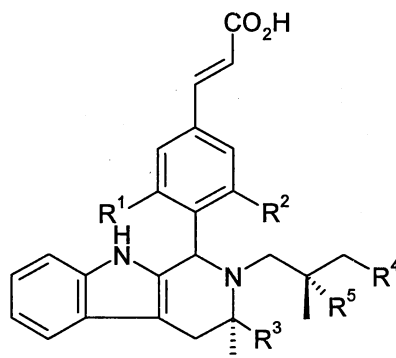
Axit isonipecotic (858g, 3,74mol) được hòa tan trong DMA (25,3L) và 4-metylmorpholin (393mL, 3,74mol) được bổ sung vào. Được khuấy trong 5 phút và isobutyl cloformat (489mL, 3,74mol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ và làm nguội đến 15°C trước khi (Z)-5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-carbohydrazonamit (940g, 3,4mol) được bổ sung từng giọt vào trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 đến 2 giờ ở nhiệt độ 15°C. Nước (20,5L) được bổ sung từng giọt vào trong 1 giờ và khuấy trong 1 giờ nữa trước khi lọc. Sau đó, bánh lọc được rửa bằng nước (4 x 4L) và hút khô trên màng lọc trước khi làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ 50°C đến khô để thu được hợp chất mong muốn.

Axit axetic (200mL) được bổ sung vào đioxan (500mL) trong bình phản ứng hai vỏ dung tích 3L và dung dịch này được gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C trong điều kiện khí nito. (Z)-tert-butyl 4-(2-(amino(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)metylen)hydrazincarbonyl)-piperidin-1-carboxylat (74,5g, 152,80mmol) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp nóng này. Sau 10 phút nhiệt độ tăng đến 100°C (hơi trào nhẹ). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong 1,5 giờ (hỗn dịch), sau đó giữ ở nhiệt độ 80°C qua đêm (dung dịch được tạo ra sau khi giữ qua đêm). Dung dịch thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm, sau đó pha loãng bằng toluen, làm bay hơi đến khô, bổ sung vào toluen và cô một lần nữa. Cặn dầu được trộn với lượng nhỏ etyl axetat và cô đến khô. Chất rắn được kết tinh từ dung dịch được nghiền với MTBE (200mL) và lọc. Bánh lọc được rửa bằng nước và MTBE để thu được tert-butyl 4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-1-carboxylat (50g, 70%) dưới dạng chất rắn màu xám.

Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn màu vàng. Hợp chất này được nghiền với MTBE và lọc. Bánh lọc được rửa bằng etyl axetat, sau đó bằng MTBE để thu được mẻ hợp chất thứ dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (4,93g, 7%). Hợp chất này là giống như hợp chất thu được ở mẻ thứ nhất: ^1H NMR: (DMSO- d_6) 1,17 (9H, s), 1,22 (9H, s), 1,29 - 1,47 (2H, m), 1,67 - 1,78 (2H, m), 2,57 - 2,87 (3H, m), 3,57 - 3,92 (2H, m), 7,56 (2H, br), 8,56 (1H, s), 13,47 (2H, br s); $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



(I)

trong đó:

R¹ và R² độc lập là H hoặc F;

R³ là H hoặc metyl; và

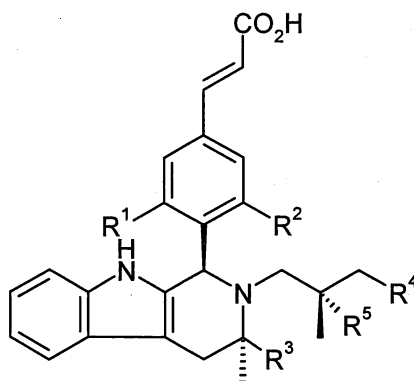
hoặc:

a) R⁴ là H và R⁵ là F; hoặc

b) R⁴ là F và R⁵ là H;

hoặc muối được dụng của nó.

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



(IA).

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R³ là hydro.

4. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R³ là metyl.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^4 là hydro và R^5 là flo.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^5 là hydro và R^4 là flo.

7. Hợp chất theo điểm 1 hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất này được chọn từ:

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

axit (E)-3-(4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

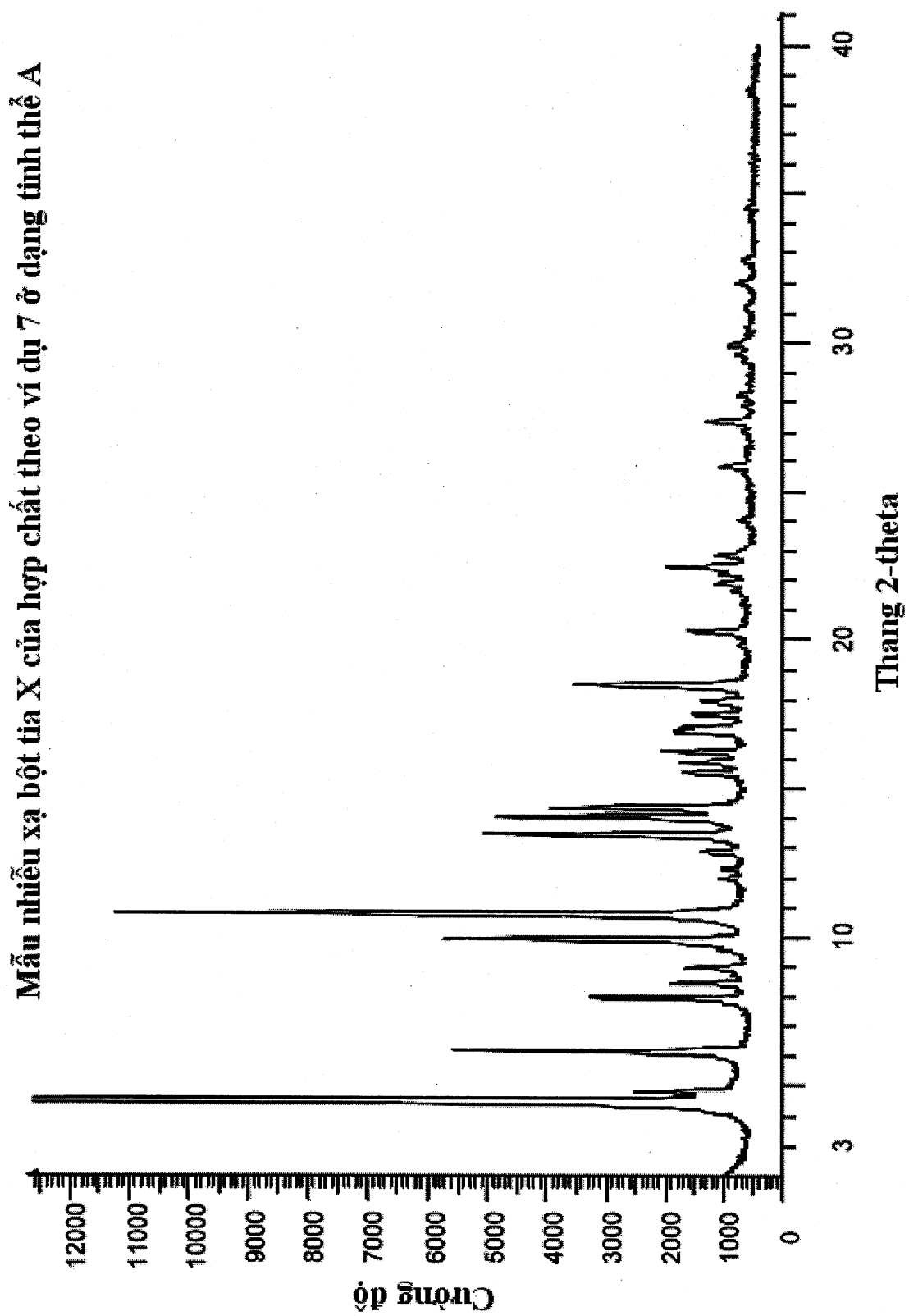
axit (E)-3-(4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic;

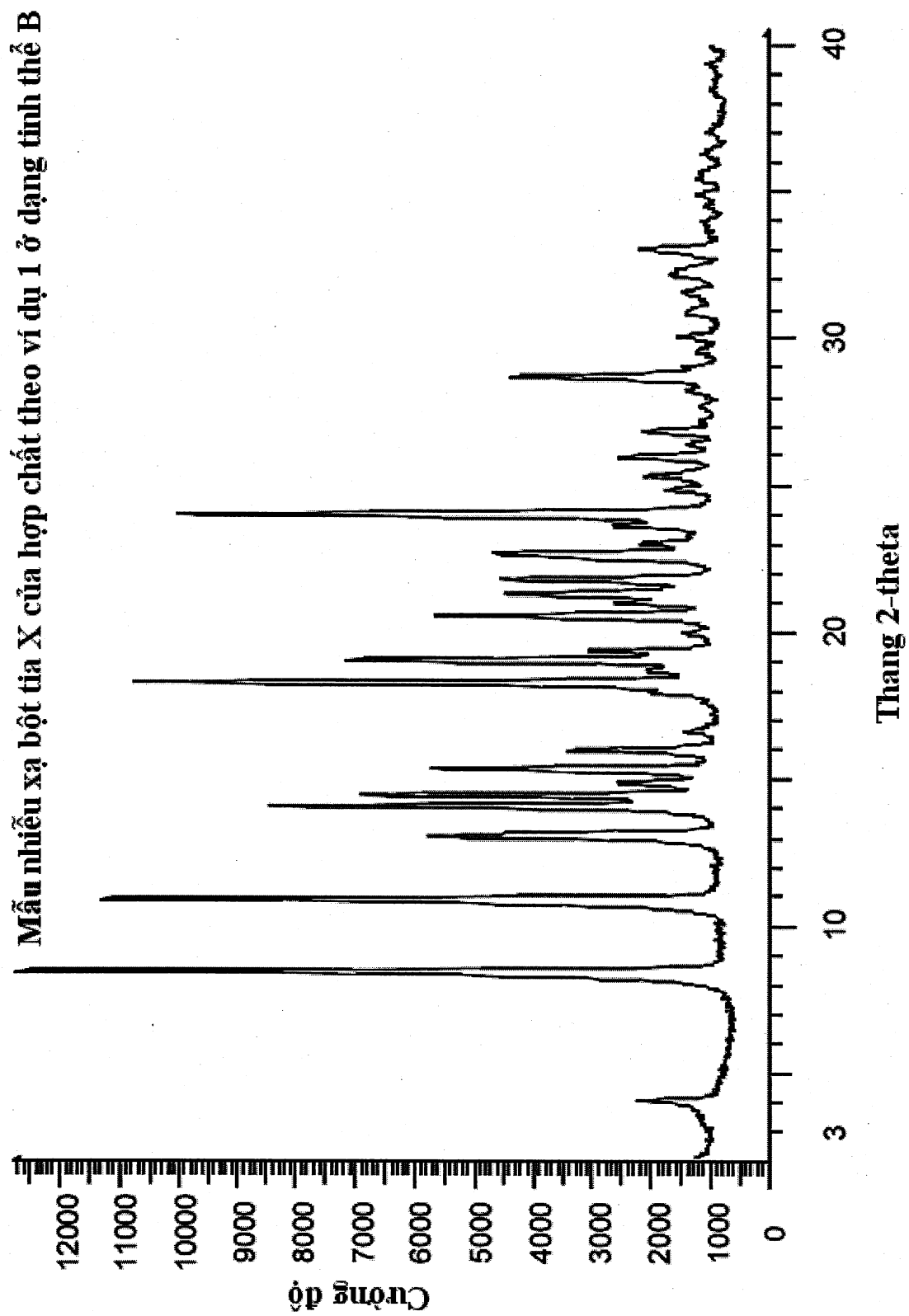
axit (E)-3-(3-flo-4-(2-((S)-3-flo-2-metylpropyl)-3,3-đimetyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic; và

axit (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-đoteri-2-(2-flo-2-metyl-propyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl]-3,5-điflo-phenyl]prop-2-enoic.

8. Hợp chất theo điểm 7, trong đó hợp chất này là axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic, hoặc muối được dụng của nó.

9. Hợp chất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic.
10. Hợp chất axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic ở dạng tinh thể có mẫu nhiễu xạ bột tia X như được thể hiện trên Fig.2.
11. Dược phẩm, chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, và tá dược pha loãng hoặc chất mang dược dụng.
12. Dược phẩm theo điểm 11, chứa axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic, hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một tá dược pha loãng hoặc chất mang dược dụng, trong đó dược phẩm này chứa ít hơn 5% khối lượng/khối lượng (R,E)-3-(3,5-điflo-4-(2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-4,9-đihydro-3H-pyrido[3,4-b]indol-2-ium-1-yl)phenyl)acrylat.
13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó dược phẩm này còn chứa chất chống oxy hóa và tùy ý còn chứa chất tạo phức chelat với kim loại.
14. Chế phẩm kết hợp thích hợp dùng để điều trị bệnh ung thư, chứa hợp chất có công thức (I) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 hoặc muối dược dụng của nó và palbociclib.
15. Chế phẩm kết hợp theo điểm 14, trong đó hợp chất có công thức (I) là axit (E)-3-(3,5-điflo-4-((1R,3R)-2-(2-flo-2-metylpropyl)-3-metyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic, hoặc muối dược dụng của nó.

**Fig.1**

**Fig.2**

Nhiệt độ đo nhiệt lượng quét vi sai của dạng tinh thể B của hợp chất theo ví dụ 1

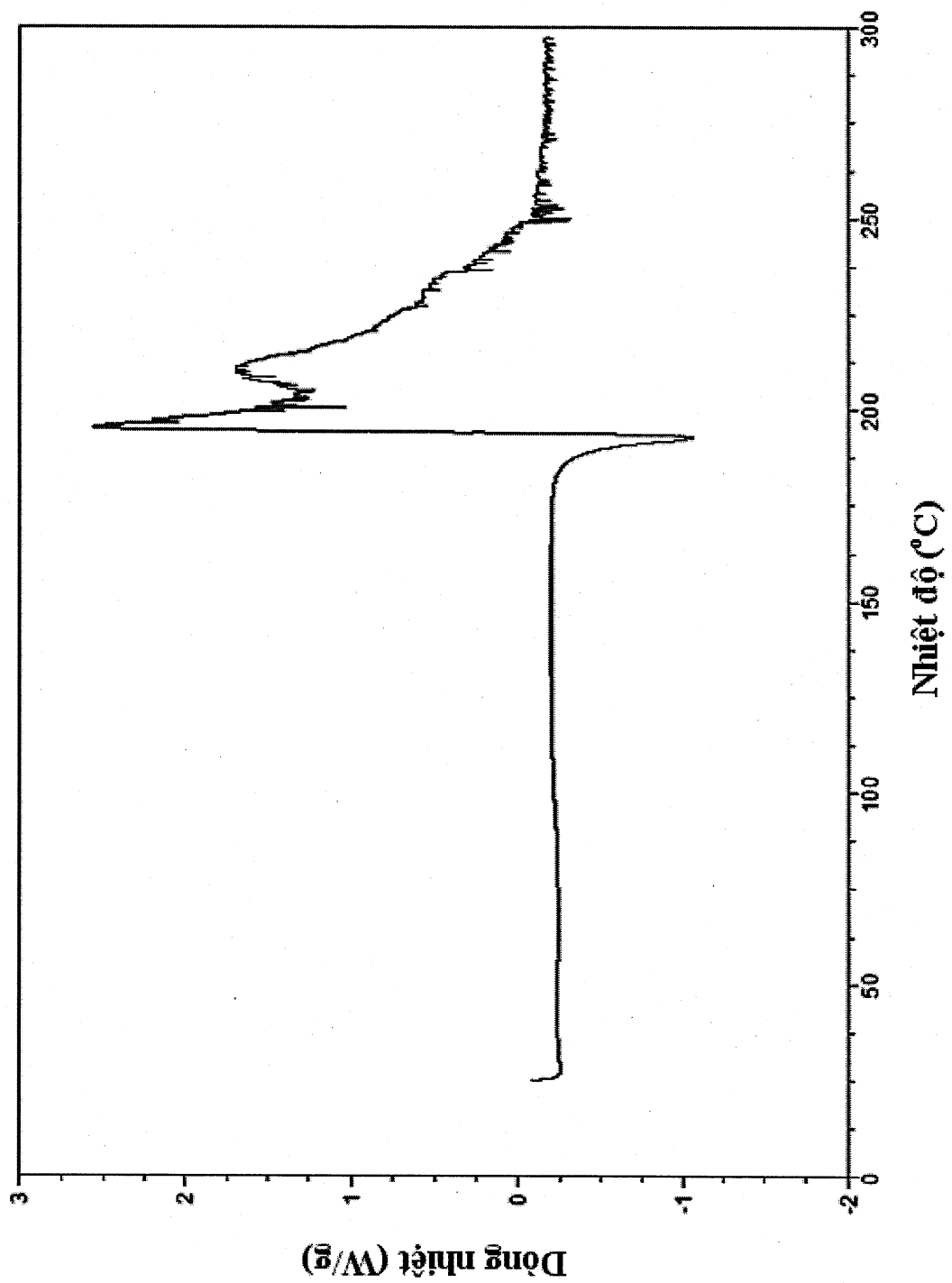


Fig.3

Mẫu nhiễu xạ bột tia X của hợp chất theo ví dụ 1 ở dạng tinh thể A

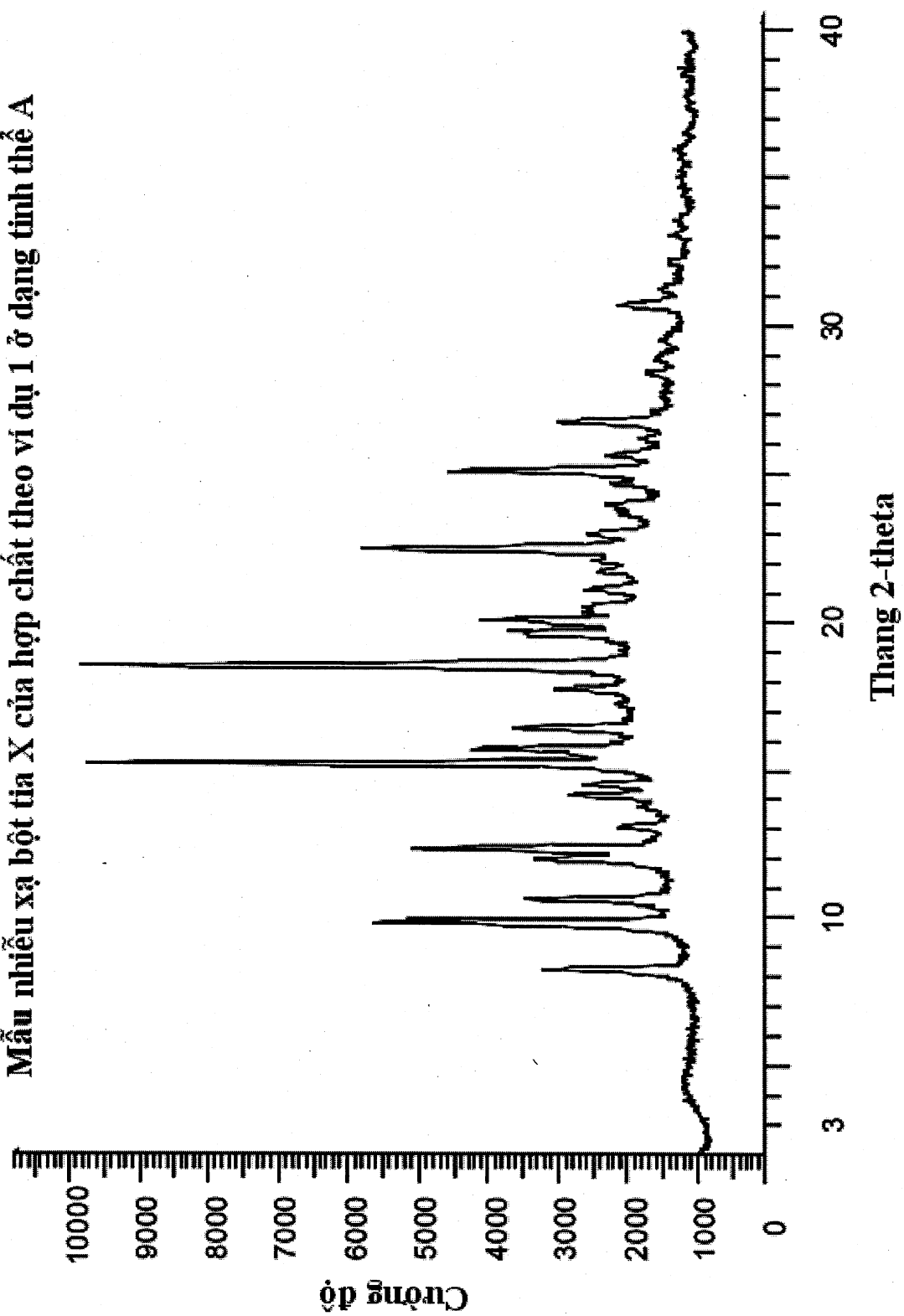


Fig.4

Nhiệt độ phân tích nhiệt trọng của dạng tinh thể A của hợp chất theo ví dụ 1

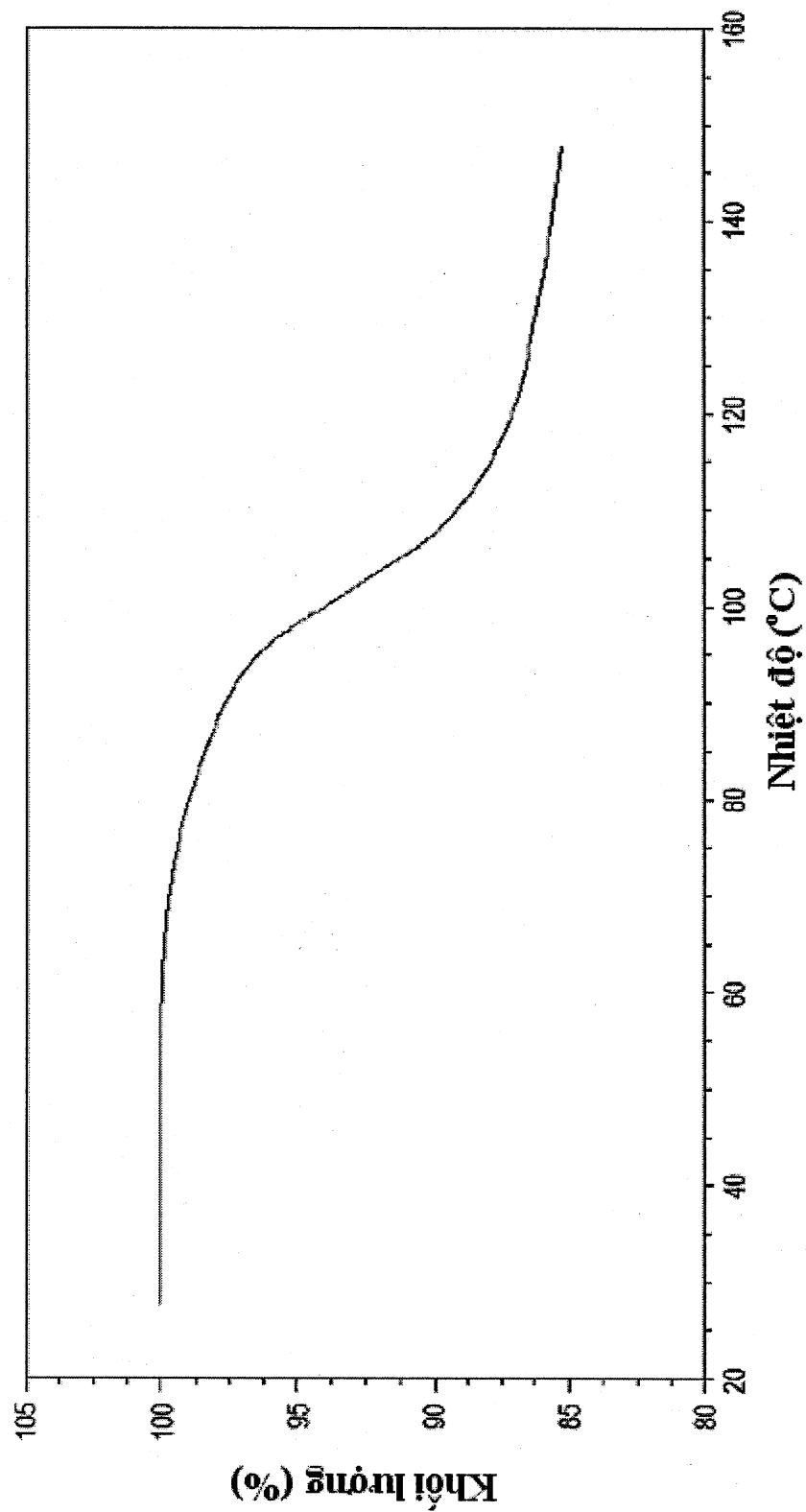
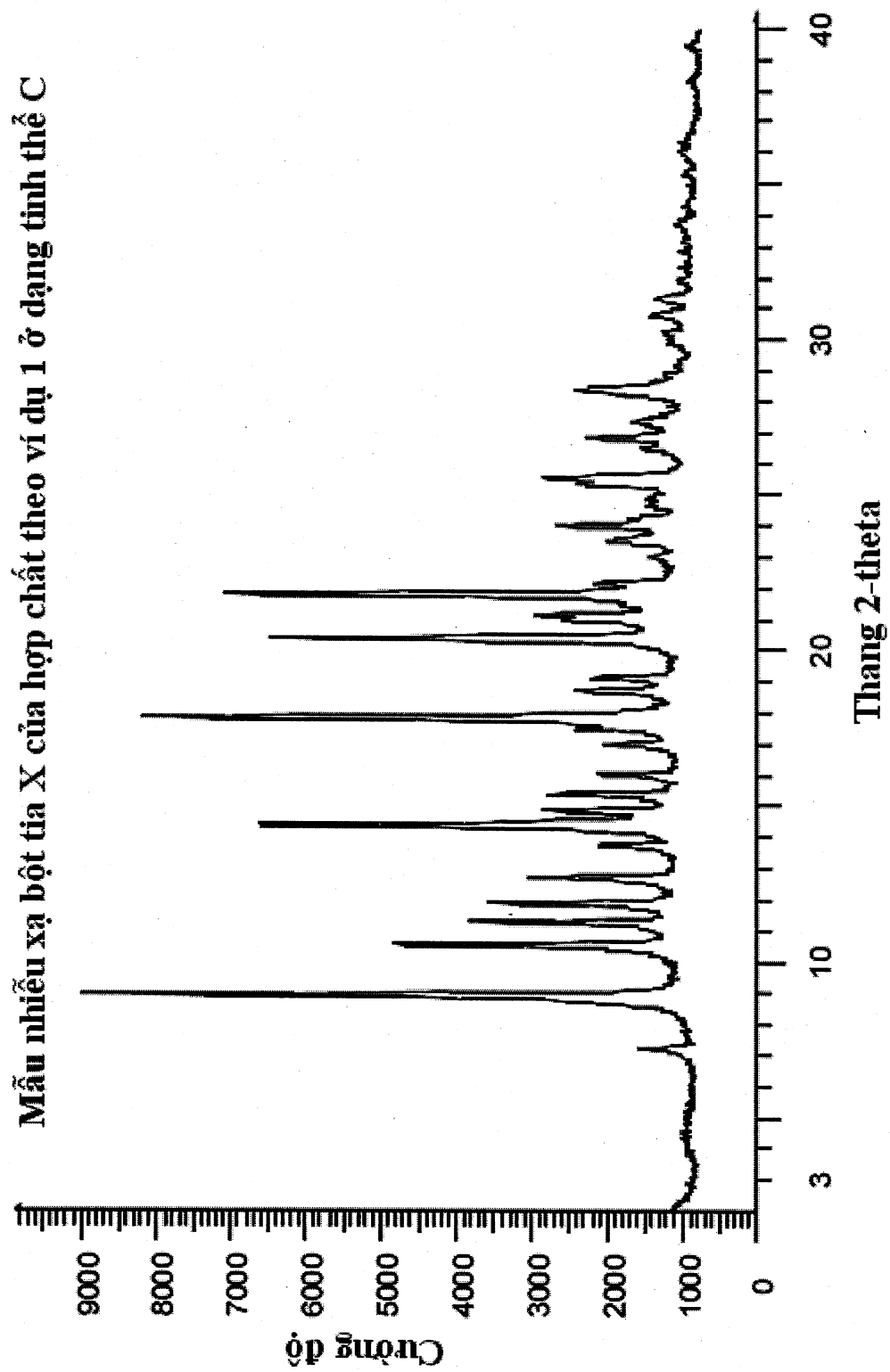
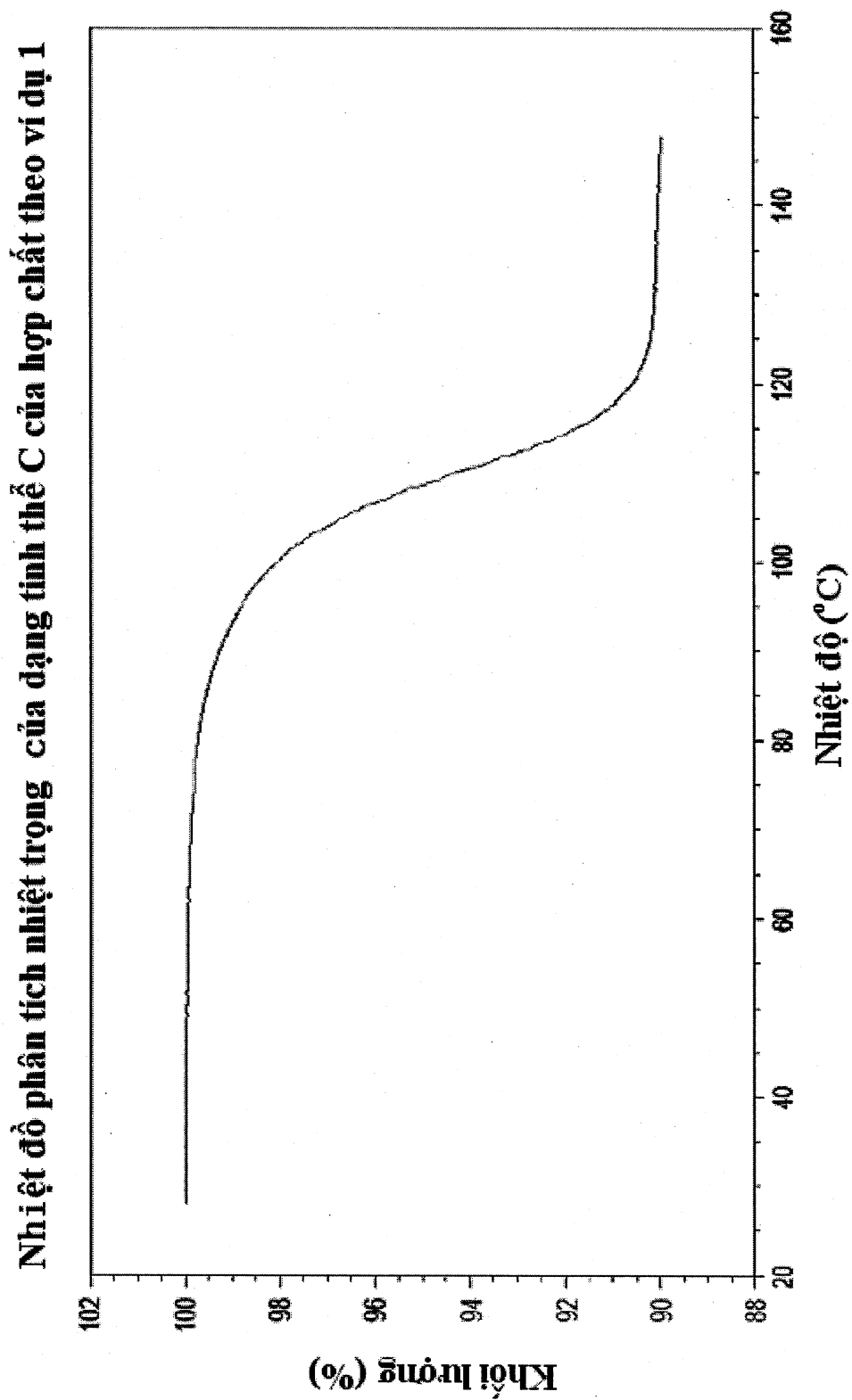


Fig.5

**Fig.6**

**Fig.7**

Mẫu nhiễu xạ bột tia X của hợp chất theo ví dụ 11

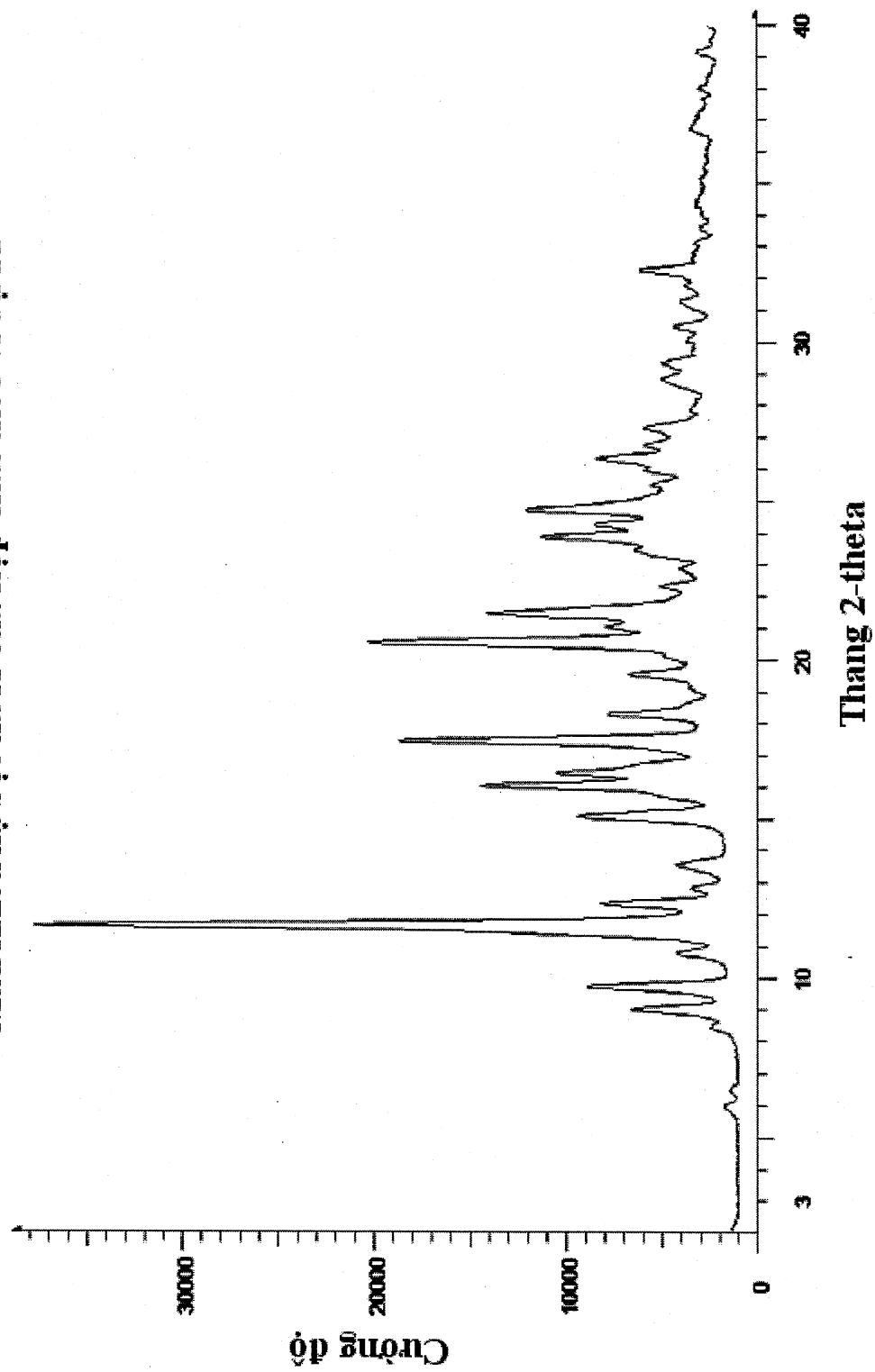


Fig.8

Đồ thị vết đo nhiệt lượng quét vi sai của hợp chất theo ví dụ 11

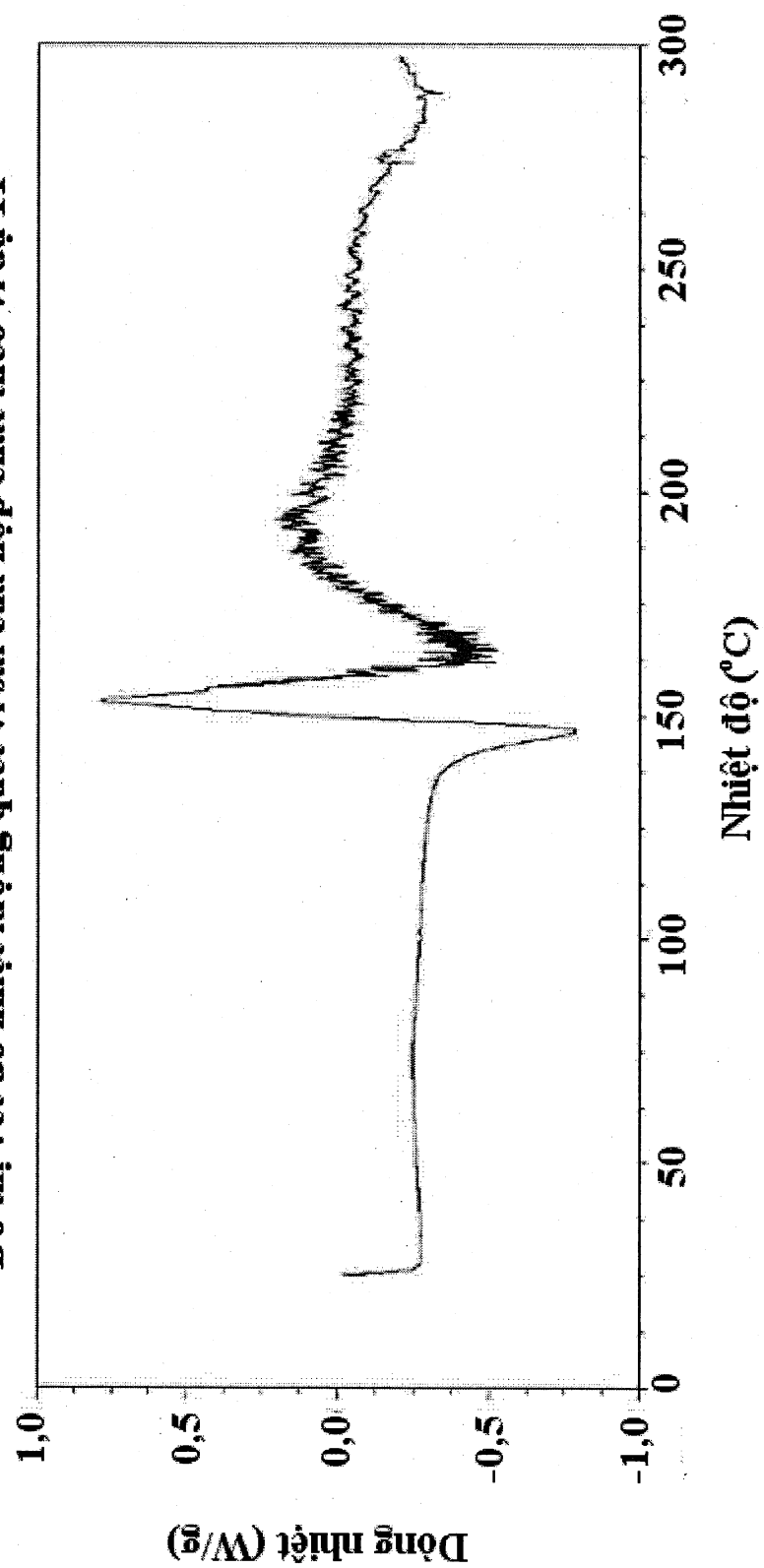


Fig.9

**Hoạt tính ức chế tế bào khối u MCF-7 ghép ngoại lai
của hợp chất theo ví dụ 1 và chất ức chế mTOR**

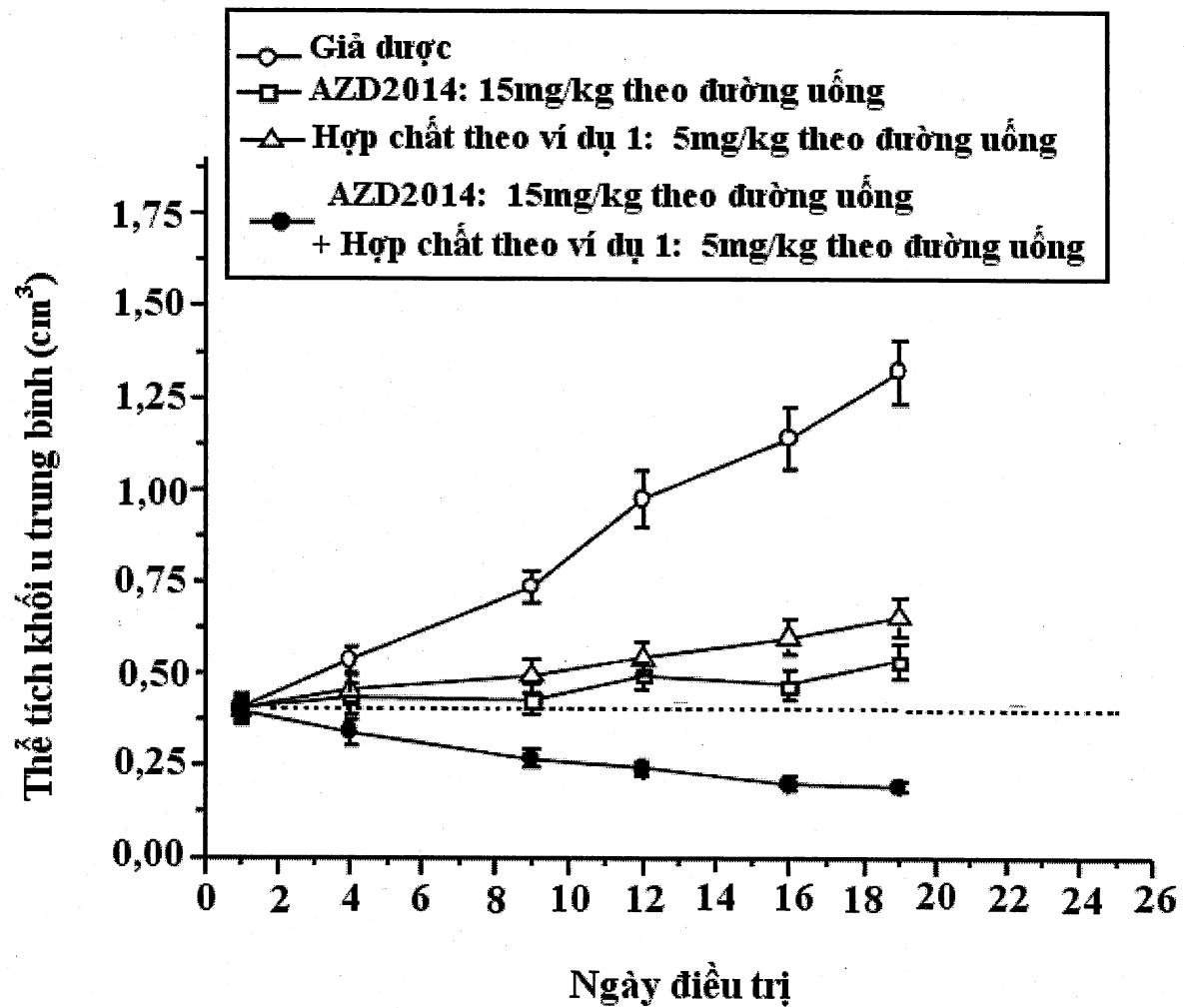


Fig.10

Hiệu quả ức chế tế bào khối u HCC1428 ghép ngoại lai trên chuột bị suy giảm estrogen kéo dài của hợp chất theo ví dụ 1

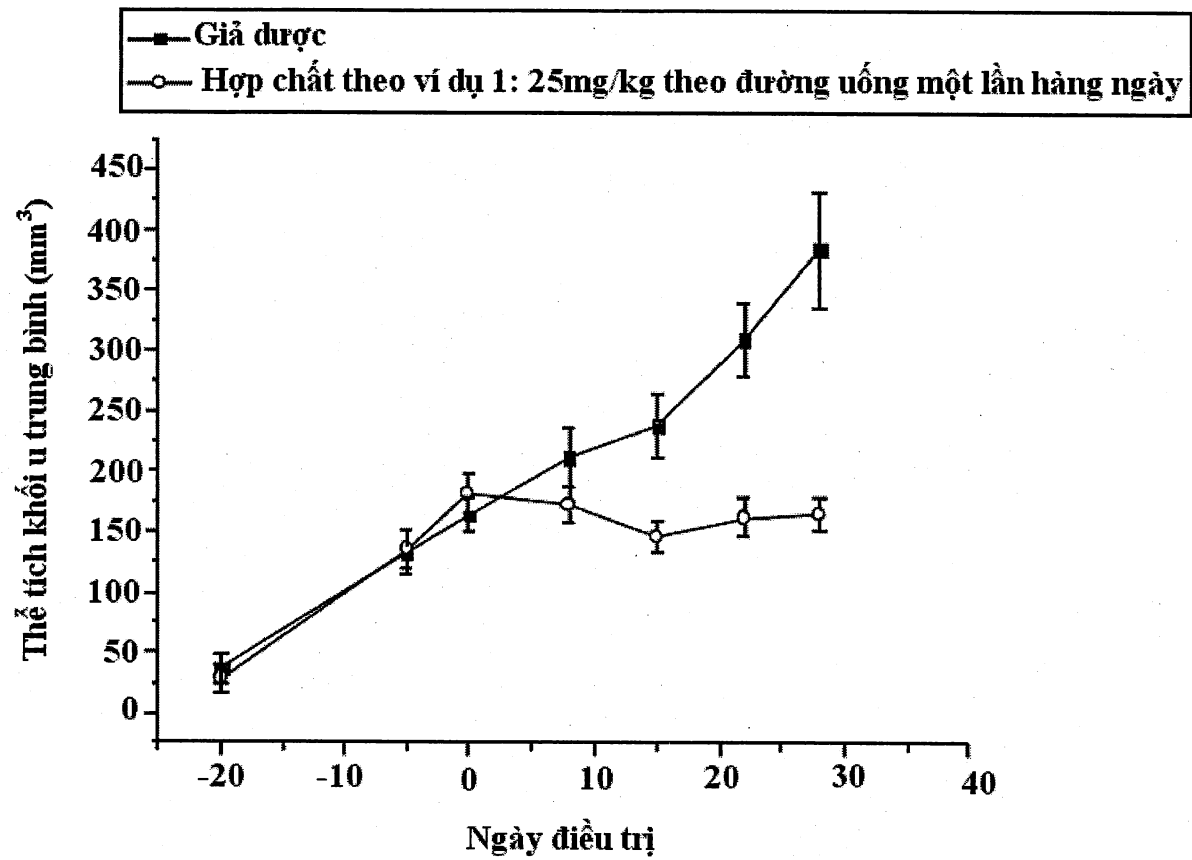


Fig.11

Hàm lượng protein ER ở các mẫu ghép ngoại lai HCC1428 LTED in vivo sau 24 giờ dùng liều lượng cuối cùng của hợp chất theo ví dụ 1

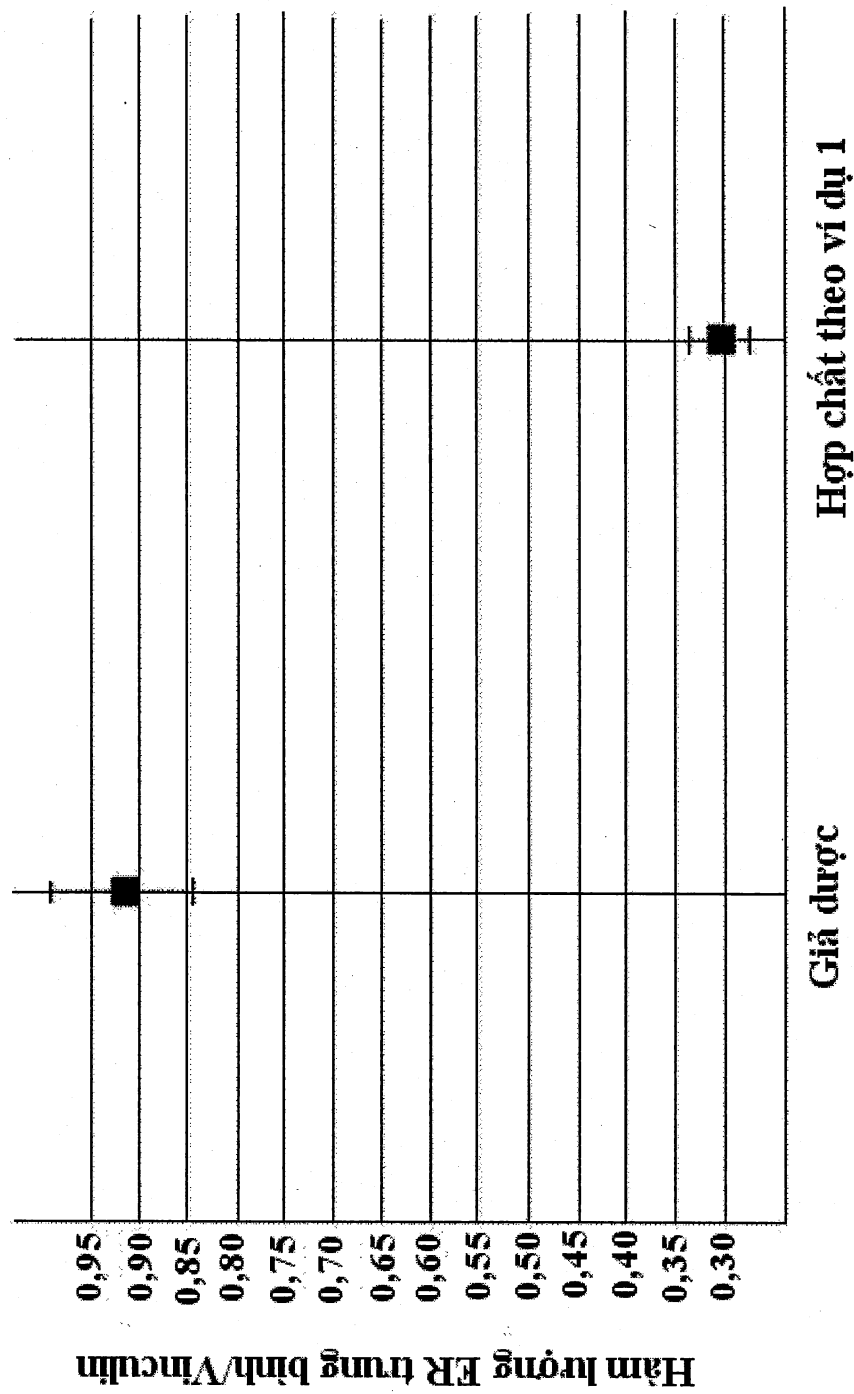


Fig.12

Hoạt chất điều trị