



(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) 
1-0021287

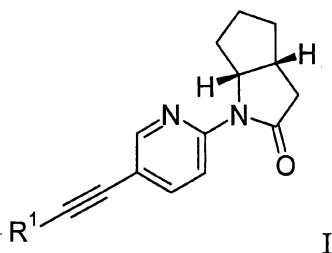
(51)⁷ **C07D 209/52, A61K 31/403, A61P**
25/00

(13) **B**

(21) 1-2015-00047 (22) 12.07.2013
(86) PCT/EP2013/064747 12.07.2013 (87) WO2014/012851 23.01.2014
(30) 12176662.0 17.07.2012 EP
(45) 25.07.2019 376 (43) 25.05.2015 326
(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland
(72) Georg Jaeschke (DE), Lothar Lindemann (DE), Heinz Stadler (CH), Eric Vieira (CH)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **HỢP CHẤT ETYNYL, QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ**

(57) **Sáng chế đề cập đến hợp chất etynyl có công thức I:**



trong đó:

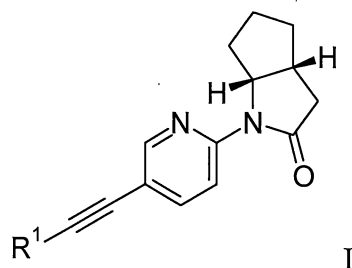
R¹ là phenyl, mà tùy ý được thế bằng 1 đến 2 nguyên tử halogen; được chọn từ flo hoặc clo;

hoặc muối cộng axit được dùng ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh.

Đã phát hiện ra rằng các hợp chất có công thức chung I là các chất điều biến dị cấu của thụ thể glutamat hướng chuyển hóa kiểu phụ 5 (mGluR5).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất etynyl có công thức I:



trong đó:

R¹ là phenyl, mà tùy ý được thế bằng 1 đến 2 nguyên tử halogen, được chọn từ flo hoặc clo;

hoặc muối cộng axit được dùng, ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh có cấu hình tuyệt đối như được thể hiện trong công thức I.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngạc nhiên phát hiện ra rằng, các hợp chất có công thức chung I là các chất điều biến dị lập thể (PAM) của thụ thể glutamat hướng chuyển hóa kiểu phụ 5 (mGluR5) mà thể hiện các tính chất sinh hóa, lý hóa và dược lực học tốt hơn so với hợp chất trong đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong hệ thần kinh trung ương (CNS), quá trình dẫn truyền các kích thích diễn ra thông qua sự tương tác của chất dẫn truyền thần kinh, mà được truyền đi bởi noron, với thụ thể thần kinh.

Glutamat là chất dẫn truyền thần kinh kích thích chính trong não và đóng vai trò đáng chú ý trong rất nhiều chức năng hệ thần kinh trung ương (CNS). Các thụ thể tiếp nhận các kích thích phụ thuộc glutamat được chia thành hai nhóm chính. Nhóm chính thứ nhất, gọi là các thụ thể hướng ion, tạo ra các kênh ion được kiểm soát bằng phối tử. Các thụ thể glutamat hướng chuyển hóa (mGluR) thuộc nhóm chính thứ hai và, ngoài ra, còn thuộc họ các thụ thể kết cặp với protein G.

Hiện tại, tám thành viên khác nhau của mGluR này đã được biết và trong số đó, có một số thành viên có các kiểu phụ. Dựa trên mức độ tương đồng về trình tự, cơ chế

tải nạp tín hiệu và tính chọn lọc chủ vận của chúng, tám thụ thể này có thể được phân chia tiếp thành ba phân nhóm:

mGluR1 và mGluR5 thuộc nhóm I, mGluR2 và mGluR3 thuộc nhóm II và mGluR4, mGluR6, mGluR7 và mGluR8 thuộc nhóm III.

Các phối tử của các thụ thể glutamat hướng chuyển hóa thuộc nhóm thứ nhất có thể được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn thần kinh cấp tính và/hoặc mạn tính như bệnh tâm thần, bệnh động kinh, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh Alzheimer, rối loạn nhận thức và bệnh suy giảm trí nhớ, cũng như chứng đau cấp tính và mạn tính.

Các chỉ định có thể điều trị khác là chức năng não bị hạn chế do phẫu thuật hoặc cấy ghép nối tắt gây ra, việc cấp máu cho não bị hạn chế, các tổn thương tủy sống, các tổn thương đầu, chứng thiếu oxy huyết do có thai, chứng ngừng tim và giảm glucoza huyết. Các chỉ định có thể điều trị khác là bệnh thiếu máu cục bộ, chứng múa giật Huntington, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS), bệnh xơ cứng củ (tuberous sclerosis - TSC), chứng sa sút trí tuệ do AIDS, các tổn thương mắt, bệnh vồng mạc, bệnh Parkinson tự phát hoặc bệnh Parkinson do thuốc gây ra cũng như các tình trạng bệnh lý mà dẫn đến các chức năng thiếu hụt glutamat, ví dụ, chứng co thắt cơ, chứng co giật, chứng đau nửa đầu, chứng đái dầm, chứng nghiện nicotin, chứng nghiện thuốc phiện, chứng lo âu, chứng nôn, chứng rối loạn vận động và bệnh trầm cảm.

Các rối loạn có nguyên nhân hoàn toàn hoặc một phần do mGluR5 là, ví dụ, quá trình thoái hóa hệ thần kinh cấp tính, do chấn thương và mạn tính, như bệnh Alzheimer, chứng sa sút trí tuệ tuổi già, bệnh Parkinson, chứng múa giật Huntington, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ và bệnh đa xơ cứng, bệnh tâm thần như bệnh tâm thần phân liệt và bệnh lo âu, bệnh trầm cảm, chứng đau và chứng nghiện thuốc (Expert Opin. Ther. Patents (2002), 12, (12)).

Hướng nghiên cứu mới để phát triển các chất điều biến chọn lọc là xác định các hợp chất tác động thông qua cơ chế dị lập thể, điều biến thụ thể bằng cách liên kết với vị trí khác vị trí liên kết đồng lập thể có mức bảo toàn mức cao. Các chất điều biến dị lập thể của mGluR5 gần đây đã nổi lên như là được chất thay thế tiềm năng. Các chất điều biến dị lập thể đã được mô tả, ví dụ, trong *WO2008/151184*, *WO2006/048771*, *WO2006/129199*, *WO2005/044797* và cụ thể là trong tài liệu *WO2011/128279* cũng như trong *Molecular Pharmacology*, 40, 333 – 336, 1991; *The Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol 313, No. 1, 199-206, 2005; *Nature*, 480 (7375), 63-68, 2012.

Các chất điều biến dị lập thể dương đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng là các hợp chất không trực tiếp hoạt hóa các thụ thể, nhưng có khả năng lớn trong việc tạo ra các đáp ứng được kích thích bởi các chất chủ vận, làm tăng hoạt lực và tối đa hóa hiệu quả. Sự liên kết của các hợp chất này làm tăng ái lực của chất chủ vận ở vị trí glutamat tại vị trí liên kết đầu tận N nằm ngoài tế bào của nó. Cơ chế điều biến dị lập thể là cơ chế hấp dẫn để làm tăng khả năng hoạt hóa các thụ thể sinh lý thích hợp. Hiện nay chưa có nhiều chất điều biến dị lập thể chọn lọc cho thụ thể mGluR5u. Các chất điều biến thụ thể mGluR5 thông thường thường không đáp ứng được độ an toàn của thuốc, dẫn đến tạo ra nhiều tác dụng phụ của thuốc hơn.

Do đó, vẫn có nhu cầu về hợp chất mà khắc phục được các nhược điểm nêu trên và tạo ra một cách hiệu quả tác dụng điều biến dị lập thể chọn lọc đối với thụ thể mGluR5. Sáng chế giải quyết vấn đề này, như được thể hiện dưới đây:

So sánh hợp chất theo sáng chế với các hợp chất tương tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật:

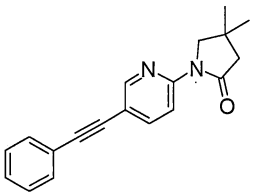
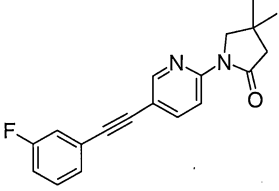
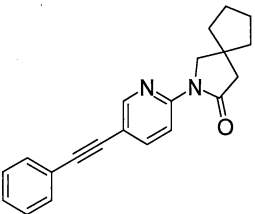
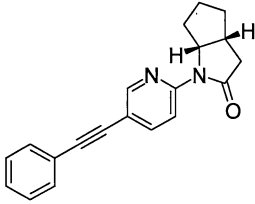
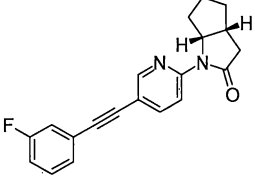
Các hợp chất có cấu trúc tương tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được bộc lộ trong WO2011128279 (= tài liệu tham chiếu 1, Hoffmann-La Roche) và các hợp chất có cấu trúc giống nhất của sáng chế này (các ví dụ 13, 40 và 59) được đưa ra để so sánh.

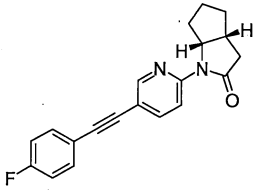
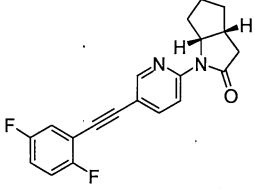
So sánh các hợp chất của sáng chế với các hợp chất tham chiếu Ví dụ 13, 40 và 59:

Tất cả các hợp chất theo sáng chế có hoạt lực tương tự với các hợp chất tham chiếu. Ngoài ra, tất cả chúng đều có hiệu lực thấp hơn 60% so với các giá trị lớn hơn nhiều của các hợp chất tham chiếu (trên 80%) mà là tiêu chí đối với khả năng dung nạp của chất điều biến dị lập thể dương mGluR5. Các hợp chất có giá trị hiệu lực cao hơn 60% thể hiện các tác dụng phụ nghiêm trọng liên quan đến CNS sau khi dùng qua đường miệng (cơn động kinh) với các liều gần với các liều mà thu được các tác dụng điều trị bệnh mong muốn (cửa sổ điều trị thấp). Các hợp chất giá trị hiệu lực thấp hơn 60% được dung nạp tốt ở các liều có thể lớn hơn từ 30 đến 1000 lần so với liều điều trị bệnh trong khi vẫn duy trì được các tác dụng điều trị bệnh mong muốn của chúng. Do

đó, nói chung, các hợp chất theo sáng chế có ưu điểm rõ ràng về độ an toàn của thuốc do các giá trị hiệu lực của chúng thấp hơn 60%, tương ứng với việc không có khả năng gây tác dụng phụ nghiêm trọng liên quan đến CNS so với các hợp chất tương tự về cấu trúc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Danh sách các ví dụ:

Ví dụ số	Cấu trúc	EC ₅₀ (nM) mGlu5 PAM	Hiệu lực [%]
Ví dụ tham chiếu 1 Ví dụ 13		37	129
Ví dụ tham chiếu 1 Ví dụ 40		15	100
Ví dụ tham chiếu 1 Ví dụ 59		16	81
1		10	45
2		10	48

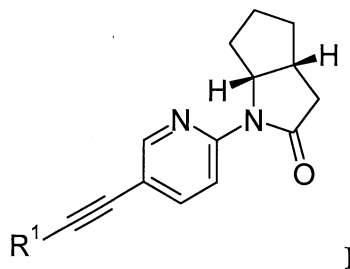
3		10	44
4		8	19

Các hợp chất có công thức I được phân biệt do có các tác dụng điều trị bệnh có giá trị. Chúng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn liên quan đến các chất điều biến dị lập thể đối với thụ thể mGluR5.

Các chỉ định được ưu tiên nhất cho các hợp chất mà là các chất điều biến dị lập thể là bệnh tâm thần phân liệt và rối loạn nhận thức.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế nhằm khắc phục các vấn đề còn tồn tại như được đề cập trên đây. Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



trong đó:

R^1 là phenyl, mà tùy ý được thế bằng 1 đến 2 nguyên tử halogen, được chọn từ flo hoặc clo;

hoặc muối cộng axit được dùng, ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh có cấu hình tuyệt đối như được thể hiện trong công thức I.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức I và muối được dụng của nó, hợp chất này dùng làm hoạt chất dược lý, quy trình để điều chế các hợp chất này cũng như các hợp chất này dùng để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn liên quan đến chất điều biến dị lập thể của thụ thể mGluR5, như bệnh tâm thần phân liệt và rối loạn nhận thức, và đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức I.

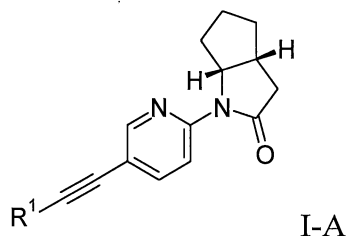
Mô tả chi tiết sáng chế

Phần định nghĩa về các thuật ngữ chung dưới đây mà được sử dụng trong phần mô tả này được áp dụng bất luận là các thuật ngữ được đề cập này xuất hiện riêng rẽ hay ở dạng kết hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "halogen" dùng để chỉ clo hoặc flo.

Thuật ngữ "muối được dụng" hoặc "muối cộng axit được dụng" bao gồm các muối với axit vô cơ và hữu cơ, như axit clohydric, axit nitric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit xitric, axit formic, axit fumaric, axit maleic, axit axetic, axit succinic, axit tarttric, axit metan-sulfonic, axit p-toluensulfonic và các axit tương tự.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức I-A:



trong đó:

R¹ là phenyl mà tùy ý được thế bằng 1 đến 2 nguyên tử flo;

hoặc muối cộng axit được dụng, ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh có cấu hình tuyệt đối như được thể hiện trong công thức I.

Các hợp chất có công thức I-A là các hợp chất sau đây:

(3aR,6aR)-1-(5-(phenyletynyl)pyridin-2-yl)hexahydrocyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on;

(3aR,6aR)-1-(5-((3-flophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydrocyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on;

(3aR,6aR)-1-(5-((4-flophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on; hoặc

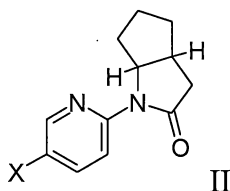
(3aR,6aR)-1-(5-((2,5-diflophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on.

Việc điều chế hợp chất có công thức I theo sáng chế có thể được tiến hành theo con đường tổng hợp theo thứ tự hoặc đồng thời. Việc tổng hợp các hợp chất theo sáng chế được thể hiện trong các sơ đồ từ 1 đến 2 dưới đây. Các kỹ năng cần thiết để tiến hành phản ứng và tinh chế các sản phẩm thu được được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phần tử thể và các chỉ số được sử dụng trong phần mô tả sau đây về các quy trình có ý nghĩa được nêu trên đây.

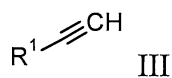
Các hợp chất có công thức I có thể được điều chế bằng các phương pháp được nêu dưới đây, các phương pháp nêu trong các ví dụ thực hiện hoặc bằng các phương pháp tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết các điều kiện phản ứng thích hợp đối với từng bước phản ứng riêng. Tuy nhiên, thứ tự phản ứng không chỉ giới hạn ở thứ tự được thể hiện trong các sơ đồ, mà phụ thuộc vào các nguyên liệu ban đầu và khả năng phản ứng tương ứng của chúng, thứ tự của các bước phản ứng có thể thay đổi tự do. Các nguyên liệu ban đầu là các nguyên liệu có thể mua được trên thị trường hoặc có thể điều chế được bằng các phương pháp tương tự như các phương pháp nêu dưới đây, bằng các phương pháp được mô tả trong các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong phần mô tả hoặc trong các ví dụ, hoặc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hợp chất có công thức I và muối được dụng của nó có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng quy trình biến đổi được mô tả dưới đây, trong đó quy trình này bao gồm bước:

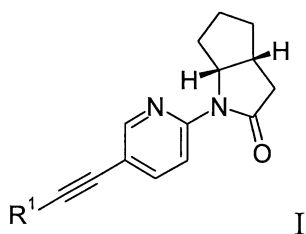
a) cho hợp chất có công thức II:



trong đó: X là nguyên tử halogen được chọn từ brom hoặc iot, và trong đó hợp chất có công thức II là hỗn hợp racemic hoặc ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh phản ứng với aryl-axetylen thích hợp có công thức III:

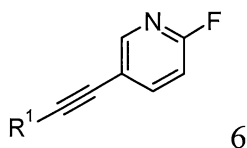


để tạo ra hợp chất có công thức I:

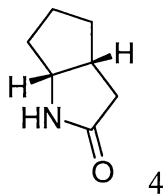


trong đó các phần tử thế được mô tả ở trên, hoặc nếu muốn, biến đổi các hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng hoặc

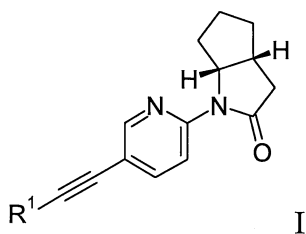
b) cho hợp chất có công thức:



phản ứng với hợp chất có công thức:



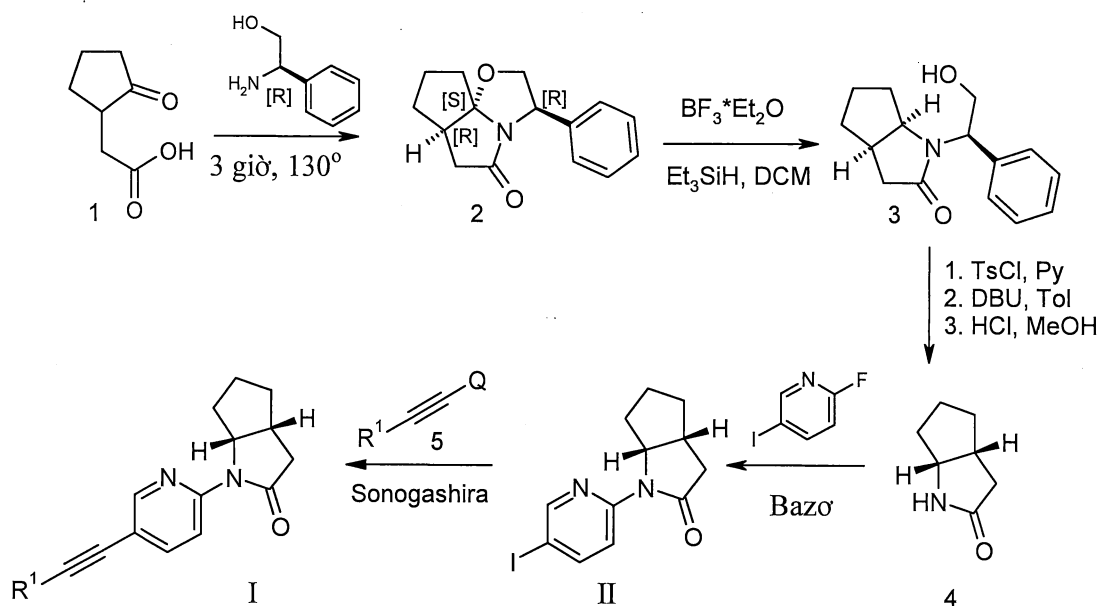
để tạo ra hợp chất có công thức:



trong đó các phần tử thế có ý nghĩa như trong điểm 1 yêu cầu bảo hộ, hoặc nếu muốn, biến đổi các hợp chất thu được thành các muối cộng axit được dùng.

Việc điều chế các hợp chất có công thức I còn được mô tả chi tiết hơn trong các sơ đồ 1 và 2 và trong các ví dụ từ 1 đến 4.

Sơ đồ 1

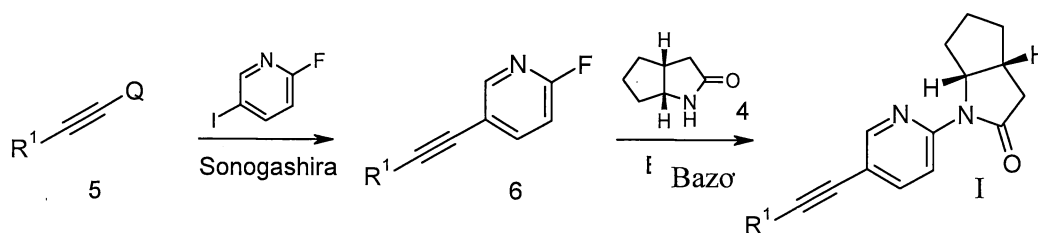


Hợp chất halo-pyridin có công thức II có thể thu được bằng phản ứng có xúc tác bazơ của pyridin được hai lần halogen hóa thích hợp như 2-flu-5-iodo-pyridin và ure hai vòng thích hợp có công thức 4 (Sơ đồ 1). Hợp chất có công thức 4 có thể thu được bắt đầu từ raxemic keto-axit có công thức 1 bằng cách cho phản ứng với (R)-phenylalaninol tinh khiết đồng phân đối ảnh để tạo ra sản phẩm trung gian ba vòng tinh khiết quang học có công thức 2 ở đó tất cả các tâm lập thể được tạo thành trong điều kiện kiểm soát lập thể hoàn toàn bằng cách sử dụng quy trình từ M. Jida & al., Green Chem. 12, 961(2010). Sản phẩm trung gian ba vòng 2 được biến đổi thành hợp chất 4 bằng cách sử dụng quy trình tương tự với quy trình được mô tả bởi Dubuffet & Lecouve trong patent châu Âu số EP1354875 đối với chất tương tự vòng cacbon có 6 cạnh. Hợp chất có công thức 2 được xử lý bằng botriflorua eterat trong các điều kiện khử để tạo ra hợp chất 3 (dẫn xuất được bảo vệ bằng N-benzyl có công thức 4) hợp chất này được khử bảo vệ thông qua trình tự loại bỏ clo hóa tiếp đó thủy phân enamin được tạo thành để thu được amit hai vòng tinh khiết đồng phân lập thể có công thức 4. Các quy trình tổng hợp khác tạo ra hợp chất raxemic hoặc hợp chất tinh khiết đồng phân đối ảnh có công thức 4 cũng đã được công bố (J. Boivin & al., Tetrahedron, 51(23), 6517(1995); S. Knapp; A. Levorse, J.Org.Chem. 53(17) 4006 (1988);

Ishibashi, & al. Tet. Asym. 7(9), 2531 (1996)). Lactam **4** sau đó được ngưng tụ với dihalo pyridin như 2-flu-5-iodopyridin trong các điều kiện xúc tác bằng bazơ (NaH/DMF; hoặc Cs₂CO₃/Toluen) để tạo ra hợp chất có công thức **II** trong đó X là iot. Cho lactam **4** phản ứng với dihalopyridin như 2-iodo-5-bromopyridin sử dụng các điều kiện phản ứng có xúc tác paladi (Buchwald) cũng có thể tạo ra hợp chất có công thức **II** trong đó X là brom. Hợp chất **II** sau đó được cho phản ứng với hợp chất arylaxetylen được thể thích hợp có công thức **5** (trong đó Q là hydro hoặc nhóm bảo vệ có thể tách ra tại chỗ như nhóm trialkylsilyl hoặc aryldialkylsilyl, tốt hơn là hydro hoặc trimetylsilyl) trong các điều kiện liên hợp có xúc tác paladi (phản ứng Sonogashira) để tạo ra các hợp chất có công thức **I**. Trong trường hợp khi sử dụng raxemic **4**, các chất đồng phân đối ảnh có thể được tách ra ở bất kỳ giai đoạn nào đã nêu trong quá trình tổng hợp các hợp chất có công thức **I** bằng cách sử dụng các quy trình đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Cũng có thể đảo ngược trình tự của các phản ứng tạo ra các hợp chất có công thức **I** (Sơ đồ 2). Trong trường hợp này, phản ứng Sonogashira giữa dẫn xuất arylaxetylen **5** và dihalo-pyridin đầu tiên được thực hiện để tạo ra hợp chất arylaxetylen-pyridin có công thức **6** hợp chất này sau đó được ngưng tụ với lactam hai vòng có công thức **4** để tạo ra các hợp chất có công thức **I**.

Sơ đồ 2



Hợp chất có công thức **I** như được mô tả trong bản mô tả này cũng như muối được dụng của nó được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh loạn tâm thần, bệnh động kinh, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh Alzheimer, các rối loạn nhận thức và suy giảm trí nhớ, cơn đau mạn tính và cấp tính, chức năng của não bị giới hạn do phẫu thuật nối tắt hoặc cấy ghép gây ra, nguồn cung cấp máu lên não bị hạn chế, các tổn thương tủy sống, các tổn thương ở đầu, bệnh thiếu oxy huyết do có thai, chứng ngừng tim và giảm glucoza-huyết, bệnh thiếu máu não, chứng múa giật Huntington, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh sa sút trí tuệ do AIDS, các tổn thương mắt, bệnh

võng mạc, bệnh Parkinson tự phát hoặc bệnh Parkinson do thuốc gây ra, bệnh co thắt cơ, bệnh co giật, bệnh đau nửa đầu, chứng đái dầm, rối loạn trào ngược dạ dày thực quản, tổn thương hoặc suy gan do thuốc hoặc bệnh gây ra, hội chứng Fragile-X, hội chứng Down, bệnh tự kỷ, bệnh nghiện nicotin, bệnh nghiện thuốc phiện, bệnh lo âu, chứng nôn mửa, bệnh rối loạn vận động, rối loạn ăn uống, cụ thể là chứng cuồng ăn vô độ hoặc chán ăn tâm thần, và bệnh trầm cảm, cụ thể là để điều trị và ngăn ngừa rối loạn thần kinh cấp tính và/hoặc mạn tính, bệnh lo âu, điều trị cơn đau mạn tính và cấp tính, chứng đái dầm và bệnh béo phì.

Các chỉ định được ưu tiên là bệnh tâm thần phân liệt và các rối loạn nhận thức.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I như được mô tả ở đây, cũng như muối được dùng của nó, để bào chế thuốc, tốt hơn là để điều trị và ngăn ngừa các rối loạn nêu trên.

Các thử nghiệm và dữ liệu sinh học và lý hóa:

Thử nghiệm huy động Ca^{2+} nội bào

Dòng tế bào HEK-293 đơn dòng được chuyển nhiễm ổn định bằng cADN mã hóa cho thụ thể mGlu5a ở người được tạo ra; để thử nghiệm với các chất điều biến dị lập thể dương mGlu5 (PAM), một dòng tế bào có mức biểu hiện thụ thể thấp và hoạt tính thụ thể cấu trúc thấp được chọn để cho phép phân biệt hoạt tính chủ vận với hoạt tính PAM. Các tế bào được nuôi cấy theo các quy trình tiêu chuẩn (Freshney, 2000) trong môi trường Eagle biến đổi của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có hàm lượng glucoza cao, được bổ sung glutamin 1mM, 10% (thể tích/thể tích) huyết thanh bào thai bê đã được làm bất hoạt bằng nhiệt, penixilin/streptomycin, hygromycin 50µg/ml và blastixidin 15µg/ml (tất cả các chất thử nuôi cấy tế bào và các chất kháng sinh đều mua từ Invitrogen, Basel, Thụy sĩ).

Khoảng 24 giờ trước thử nghiệm, 5×10^4 tế bào/lỗ được gieo mầm trong các đĩa 96 lỗ phủ poly-D-lysin, đáy màu đen/trong suốt. Các tế bào này được nạp 2,5µM Fluo-4AM trong đệm nạp (1xHBSS, 20mM HEPES) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C và rửa năm lần bằng đệm nạp. Các tế bào này được chuyển vào hệ thống sàng lọc chức năng được chất - Functional Drug Screening System 7000 (Hamamatsu, Paris, Pháp), và 11 dung dịch pha loãng theo dãy 1/2 log của hợp chất thử nghiệm ở nhiệt độ 37°C được bổ sung vào và các tế bào này được ủ trong thời gian từ 10 đến 30 phút kèm với việc

ghi trực tuyến mức độ phát huỳnh quang. Sau bước ủ trước này, bổ sung chất chủ vận L-glutamat vào các tế bào ở nồng độ tương ứng với EC_{20} (thường khoảng $80\mu M$) kèm theo ghi trực tuyến mức độ phát huỳnh quang; để tính toán các thay đổi theo từng ngày của đáp ứng của các tế bào, EC_{20} của glutamat được xác định ngay trước mỗi thử nghiệm bằng cách ghi lại đường cong đáp ứng liều hoàn chỉnh của glutamat.

Các đáp ứng được tính bằng cách lấy mức phát huỳnh quang tăng cao nhất trừ đi giá trị cơ sở (tức là mức độ phát huỳnh quang mà không cần bổ sung L-glutamat), các giá trị đáp ứng này được chuẩn hóa theo tác dụng kích thích tối đa thu được ở các nồng độ bão hòa của L-glutamat. Các đồ thị được xây dựng từ % kích thích tối đa sử dụng XLfit, chương trình khớp đường cong mà xây dựng đồ thị lặp lại từ các dữ liệu thử nghiệm sử dụng thuật toán Levenburg Marquardt. Sử dụng phương trình phân tích cạnh tranh một điểm: $y = A + ((B-A)/(1+((x/C)^D)))$, trong đó y là % tác dụng kích thích tối đa, A là y cực tiểu, B là y cực đại, C là EC_{50} , x là $\log_{10}$ của nồng độ của hợp chất cạnh tranh và D là độ dốc của đường cong (hệ số Hill). Từ các đường cong này, EC_{50} (nồng độ tại đó thu được mức kích thích bằng một nửa mức tối đa), hệ số Hill cũng như mức đáp ứng tối đa (=hiệu lực) tính bằng % tác dụng kích thích tối đa thu được các nồng độ bão hòa của L-glutamat cũng được tính.

Các tín hiệu dương thu được khi ủ trước hợp chất với các hợp chất thử nghiệm PAM (tức là trước khi sử dụng L-glutamat ở nồng độ EC_{20}) là dấu hiệu cho thấy có hoạt tính chủ vận, nếu không có các tín hiệu này nghĩa là không có hoạt tính chủ vận. Tín hiệu quan sát thấy giảm sau khi bổ sung L-glutamat ở nồng độ EC_{20} là dấu hiệu cho thấy hợp chất thử nghiệm có hoạt tính ức chế.

Trong danh sách các hợp chất ví dụ dưới đây, toàn bộ các hợp chất này đều có các giá trị EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM.

Ví dụ	EC_{50} (nM) mGlu5 PAM
1	10
2	10
3	10
4	8

Các hợp chất có công thức (I) và các muối được dụng của nó có thể được dùng làm thuốc, ví dụ, ở dạng dược phẩm. Dược phẩm có thể được dùng qua đường miệng, ví dụ, ở dạng viên nén, viên nén được bao, viên thuốc bao đường, viên nang gelatin cứng và mềm, dung dịch, nhũ tương hoặc huyền phù. Tuy nhiên, việc dùng dược phẩm này cũng có thể thu được hiệu quả khi thực hiện qua trực tràng, ví dụ, ở dạng thuốc đạn hoặc ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, ở dạng dung dịch tiêm.

Các hợp chất có công thức (I) và các muối được dụng của nó có thể được phối chế cùng với các chất mang vô cơ hoặc hữu cơ, không có hoạt tính dược lý để bào chế thành các dược phẩm. Lactoza, tinh bột ngô hoặc các dẫn xuất của nó, bột talc, axit stearic hoặc các muối của nó và các chất tương tự có thể được sử dụng, ví dụ, các chất mang dùng cho viên nén, viên nén được bao, viên thuốc bao đường và viên nang gelatin cứng. Các chất mang thích hợp cho các viên nang gelatin mềm, ví dụ, dầu thực vật, sáp, chất béo, rượu polyhydric bán rắn và lỏng và các chất mang tương tự; tuy nhiên, tùy thuộc vào bản chất của hoạt chất, trong trường hợp viên nang gelatin mềm chất mang thường không cần dùng tới. Các chất mang thích hợp để sản xuất dung dịch và si-rô là, ví dụ, nước, rượu polyhydric, sucroza, đường nghịch đảo, glucoza và các chất mang tương tự. Các chất phù trợ, như các rượu, rượu polyhydric, glyxerol, dầu thực vật và các chất phù trợ tương tự, có thể được sử dụng cho dung dịch nước tiêm chứa các muối tan trong nước của các hợp chất có công thức (I), nhưng về nguyên tắc các chất mang là không cần thiết. Các chất mang thích hợp cho các thuốc đạn, ví dụ, dầu tự nhiên hoặc hóa rắn, sáp, chất béo, rượu polyhydric bán lỏng hoặc lỏng và các chất mang tương tự.

Ngoài ra, dược phẩm có thể chứa các chất bảo quản, các chất làm tan, các chất làm ổn định, các chất tạo ẩm, các chất nhũ hóa, các chất tạo ngọt, các chất tạo màu, các chất tạo hương vị, các muối để làm thay đổi áp suất thẩm thấu, các chất đệm, các chất che mùi hoặc các chất chống oxy hóa. Các dược phẩm này cũng có thể còn chứa các chất khác có tác dụng điều trị bệnh.

Như được nêu trên đây, các thuốc chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó và tá dược không có tác dụng điều trị bệnh cũng là một đối tượng của sáng chế, cũng như quy trình bào chế các thuốc này, quy trình này bao gồm việc phối chế một hoặc nhiều hợp chất công thức I hoặc muối được dụng của nó và, nếu

cần, một hoặc nhiều chất có tác dụng điều trị bệnh thành dạng liều y lý cùng với một hoặc nhiều chất mang không có tác dụng trị bệnh.

Như cũng đã được đề cập ở trên, việc sử dụng hợp chất có công thức (I) để bào chế thuốc có tác dụng ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nêu trên cũng là một đối tượng của sáng chế.

Liều lượng có thể thay đổi trong giới hạn rộng và tất nhiên, sẽ phù hợp với từng yêu cầu trong từng trường hợp cụ thể. Nhìn chung, liều hữu hiệu để dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20mg/kg/ngày, với liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10mg/kg/ngày là được ưu tiên cho tất cả chỉ định bệnh đã nêu. Liều dùng hằng ngày cho người lớn có cân nặng 70 kg tương ứng nằm trong khoảng từ 0,7 đến 1400mg trong một ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7 đến 700mg một ngày.

Bào chế được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế:

Các viên nén có thành phần dưới đây được bào chế bằng phương pháp thông thường:

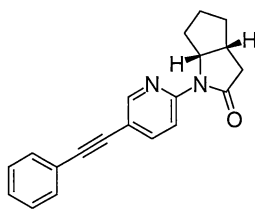
mg/viên nén

Thành phần hoạt tính	100
Lactose dạng bột	95
Tinh bột ngô màu trắng	35
Polyvinylpyrrolidon	8
Na carboxymetyl tinh bột	10
Magie stearat	2
Trọng lượng viên	250

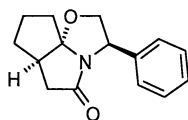
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

(3aR,6aR)-1-(5-(phenyletynyl)pyridin-2-yl)hexahydrocyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on

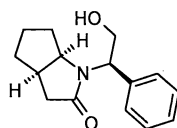


Bước 1: (1S,5aR)-(R)-3-phenyl-hexahydro-1-oxa-3a-aza-xyclopenta[c]pentalen-4-on:



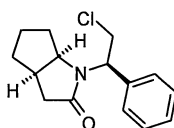
Hỗn hợp của axit (rac)-2-(2-oxoxyclopentyl)axetic (1030 mg, 7,25 mmol) và (R)-2-amino-2-phenyletanol (994 mg, 7,25 mmol) trong lọ kín dung tích 20ml được gia nhiệt trong 3 giờ ở 130°C và được để nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Phần cặn được hấp phụ trong 50 ml diclometan. Pha hữu cơ được rửa một lần bằng 10 ml dung dịch HCl 1N và một lần bằng 10 ml dung dịch NaHCO₃ bão hòa. Sau khi làm khô bằng magie sulfat và cô trong chân không, thu được 1,6 g (91%) hợp chất ở đề mục hầu như tinh khiết dưới dạng dầu màu nâu nhạt, chất này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo MS: m/e = 244,0 (M+H⁺).

Bước 2: (R)-1-((R)-hydroxy-1-(R)-phenetyl)-hexahydro-xyclopenta[b]pyrol-2-on:



Thêm bo triflorua eterat (5,6 g, 5,00 ml, 39,5 mmol, 6,0 đương lượng) và trietylsilan (1,53 g, 2,1 ml, 13,2 mmol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch của (1S,5aR)-(R)-3-phenyl-hexahydro-1-oxa-3a-aza-xyclopenta[c]pentalen-4-on (1,6 g, 6,58 mmol) trong diclometan (10 ml). Sau khi khuấy trong 20 giờ ở nhiệt độ 50°C phản ứng này được để ấm đến nhiệt độ trong phòng và độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng cách bổ sung dung dịch NaHCO₃ 5%. Sau khi chiết bằng diclometan, nước, làm khô và cô trong chân không, thu được hợp chất ở đề mục hầu như là tinh khiết, (1,6 g, 99%), dưới dạng dầu màu nâu nhạt chất này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo MS: m/e = 246,2 (M+H⁺).

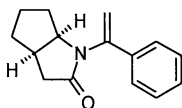
Bước 3: (R)-1-((R)-clo-1-(R)-phenetyl)-hexahydro-xyclopenta[b]pyrol-2-on:



Bổ sung pyridin (929 mg, 950 µl, 11,7 mmol) vào dung dịch của (3aR,6aR)-1-((R)-2-hydroxy-1-phenyletyl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on (1,6 g, 6,52

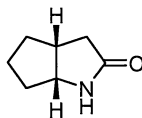
mmol) trong diclometan (10 ml). Dung dịch này sau đó được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung p-toluensulfonyl clorua (1,49 g, 7,83 mmol, 1,2 đương lượng) thành các phần trong khoảng thời gian hơn 5 phút. Sau khi khuấy trong 30 phút ở 5°C, phản ứng này được để ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 20 phút nữa. Sau khi chiết bằng diclometan/nước, xử lý theo chuẩn và cô trong chân không, thu được 1,59 g nguyên liệu thô, nguyên liệu này sau đó được hòa tan trong 50 ml diclometan bổ sung khoảng 15 g silicagel vào đó. Sau khi khuấy trong 5 phút, dung môi được làm bay hơi. Phần cặn được tạo huyền phù trong diclometan. Các chất rắn được lọc ra và được rửa ba lần bằng 20 ml của hỗn hợp diclometan và etyl axetat theo tỷ lệ 1:1. Phần dịch lọc được cô trong chân không để tạo ra 1,45 g (84%) hợp chất ở thể mờ hầu như tinh khiết dưới dạng dầu màu nâu nhạt, chất này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo MS: $m/e = 264,1, 266,2 (M+H^+)$.

Bước 4: (3aR,6aR)-1-(1-phenylvinyl)hexahydroxyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on:



Dung dịch của (R)-1-((R)-clo-1-(R)-phenetyl)-hexahydro-xyclopenta[b]pyrrol-2-on (1,4 g, 5,31 mmol) trong 20 ml toluen được xử lý bằng DBU (1,01 g, 1,00 ml, 6,63 mmol, 1,25 đương lượng). Phản ứng này được hồi lưu trong 2 giờ, cô trong chân không, chiết bằng etyl axetat /nước, làm khô và cô trong chân không để tạo ra 1,19 g (99%) hợp chất ở thể mờ này dưới dạng dầu màu nâu nhạt, MS: $m/e = 228.3 (M+H^+)$, chất này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

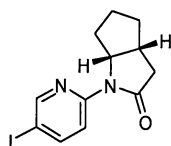
Bước 5: (-)-(R)-hexahydro-xyclopenta[b]pyrrol-2-on:



Bổ sung dung dịch HCl 4M (7,92 ml, 31,7 mmol, 6,0 đương lượng) vào dung dịch của (3aR,6aR)-1-(1-phenylvinyl)hexahydroxyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on (1,2 g, 5,28 mmol) trong 5ml metanol và phản ứng này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Độ pH của phản ứng được điều chỉnh đến 7 bằng cách bổ sung dung dịch NaOH 4M (khoảng 8 ml), ete (20 ml) và pha nước được làm bão hòa bằng natri clorua và được chiết hai lần bằng etyl axetat. Sau khi làm khô bằng magie sulfat và cô trong

chân không, thu được 1,0 g dầu màu vàng nhạt chứa sản phẩm và axetophenon. Sau khi tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silicagel (20 g) bằng cách sử dụng gradien của etyl axetat 20% đến 100% trong heptan tiếp theo là rửa giải bằng MeOH 2% trong etyl axetat tạo ra 0,66 g (53%) hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt, số liệu NMR của hợp chất này tương ứng một cách chính xác với các số liệu được báo cáo trong tài liệu chuyên ngành. Nguyên liệu này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

Bước 6: (3aR,6aR)-1-(5-iodopyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on:



Bổ sung Cs_2CO_3 (656 mg, 2,01 mmol, 1,2 đương lượng) vào dung dịch của (3aR,6aR)-hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on (210mg, 1,68 mmol) và 2-flo-5-iodopyridin (412 mg, 1,85 mmol, 1,1 đương lượng) trong toluen (1,1 ml). Phản ứng này được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ 105°C . Phần cặn được hấp phụ trong etyl axetat, các chất rắn được lọc ra và được rửa bằng etyl axetat. Phần dịch lọc được cô trong chân không và phần cặn được tinh chế bằng cách sắc ký nhanh (SiO_2 , 20g) bằng cách sử dụng gradien của etyl axetat 0% đến 60% trong heptan. Thu được hợp chất ở đề mục này, (300 mg, 55%), dưới dạng dầu không màu, MS: $m/e = 329,4$ ($\text{M}+\text{H}^+$).

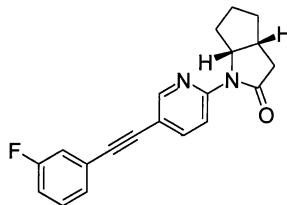
Bước 7: (-)-(3aR,6aR)-1-(5-(phenyletynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on

Trong ống Pyrex dung tích 10 ml hòa tan (3aR,6aR)-1-(5-iodopyridin-2-yl)hexahydro-xyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on (107 mg, 326 μmol) trong 2ml THF. Argon được thổi qua dung dịch này. Etynylbenzen (59,9 mg, 64,5 μl , 587 μmol , 1,8 đương lượng), triethylamin (99,0 mg, 136 μl , 978 μmol , 3,0 đương lượng), bis(triphenylphosphin)paladi(II) clorua (13,7 mg, 19,6 μmol , 0,06 đương lượng), triphenylphosphin (1,71 mg, 6,52 μmol , 0,02 đương lượng), và đồng (I) iodua (1,86 mg, 9,78 μmol , 0,03 đương lượng) được bổ sung. Dung dịch màu nâu sẫm được khuấy ở 50°C trong 2 giờ. Phần cặn được hấp phụ trong etyl axetat, các chất rắn được lọc ra và được rửa bằng etyl axetat. Phần dịch lọc được cô trong chân không và phần cặn được tinh chế bằng cách sắc ký nhanh (SiO_2 , 20g) bằng cách sử dụng gradien của etyl

axetat 0% đến 60% trong heptan. Thu được 95 mg (96%) hợp chất ở đề mục này dưới dạng dầu nhớt màu vàng, MS: $m/e = 303,2$ ($M+H^+$).

Ví dụ 2

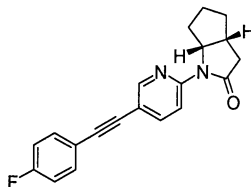
(3aR,6aR)-1-(5-((3-flophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on



Hợp chất ở đề mục này được điều chế theo phương pháp chung của Ví dụ 1, bước 7 bằng cách sử dụng (3aR,6aR)-1-(5-iodopyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on (107 mg, 0,326 mmol) (*Ví dụ 1, bước 6*) và 1-etynyl-3-flobenzen để tạo ra 100 mg (96%) hợp chất ở đề mục này dưới dạng dầu nhớt màu vàng; MS: $m/e = 321,2$ ($M+H^+$).

Ví dụ 3

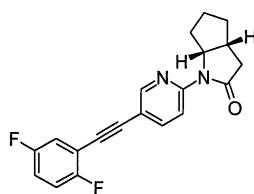
(3aR,6aR)-1-(5-((4-flophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on



Hợp chất ở đề mục này được điều chế theo phương pháp chung của Ví dụ 1, bước 7 bằng cách sử dụng (3aR,6aR)-1-(5-iodopyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on (100 mg, 0,305 mmol) (*Ví dụ 1, bước 6*) và 1-etynyl-4-flobenzen để tạo ra 75 mg (77%) hợp chất ở đề mục này dưới dạng dầu nhớt màu vàng; MS: $m/e = 321,2$ ($M+H^+$).

Ví dụ 4

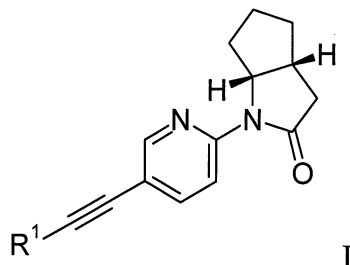
(3aR,6aR)-1-(5-((2,5-Diflophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrol-2(1H)-on



Hợp chất ở đề mục này được điều chế theo phương pháp chung của Ví dụ 1, bước 7 bằng cách sử dụng (3aR,6aR)-1-(5-iodopyridin-2-yl)hexahydrocyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on (140 mg, 0,427 mmol) (Ví dụ 1, bước 6) và 1-etynyl-2,5-diflobenzen để tạo ra 142 mg (98%) hợp chất ở đề mục này dưới dạng dầu nhớt màu nâu nhạt; MS: $m/e = 339,5$ ($M+H^+$).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất etynyl có công thức I:

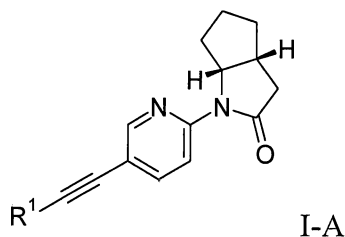


trong đó:

R^1 là phenyl, mà tùy ý được thế bằng 1 đến 2 nguyên tử halogen, được chọn từ flo hoặc clo;

hoặc muối cộng axit được dùng ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh.

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



trong đó:

R^1 là phenyl mà tùy ý được thế bằng 1 đến 2 nguyên tử flo;

hoặc muối cộng axit được dùng ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các hợp chất có công thức I hoặc I-A này là:

(3aR,6aR)-1-(5-(phenyletynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on;

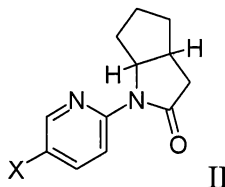
(3aR,6aR)-1-(5-((3-flophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on;

(3aR,6aR)-1-(5-((4-flophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydroxyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on; hoặc

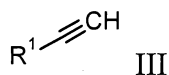
(3aR,6aR)-1-(5-((2,5-diflophenyl)etynyl)pyridin-2-yl)hexahydrocyclopenta[b]pyrrol-2(1H)-on.

4. Quy trình điều chế hợp chất có công thức I theo điểm 1, quy trình này bao gồm các phương án:

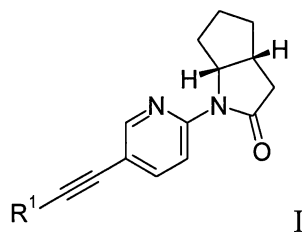
a) cho hợp chất có công thức II



trong đó X là nguyên tử halogen được chọn từ brom hoặc iot, và trong đó hợp chất có công thức II là hỗn hợp racemic hoặc ở dạng tinh khiết đồng phân đối ảnh phản ứng với aryl-axetylen thích hợp có công thức III:

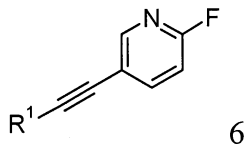


để tạo ra hợp chất có công thức I:

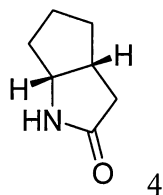


trong đó các phần tử thế được mô tả ở trên, hoặc nếu muốn, biến đổi các hợp chất thu được thành muối cộng axit được dụng hoặc

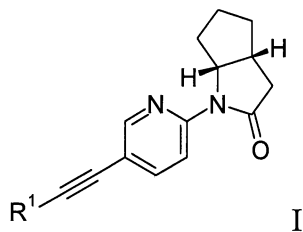
b) cho hợp chất có công thức:



phản ứng với hợp chất có công thức:



để tạo ra hợp chất có công thức:



trong đó các phần tử thể có ý nghĩa như trong điểm 1 yêu cầu bảo hộ, hoặc nếu muốn, biến đổi các hợp chất thu được thành các muối cộng axit được dụng.

5. Dược phẩm bao gồm ít nhất một trong các hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 cũng như muối được dụng của nó.