



(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) 
1-0022719

(51)⁷ **C07D 487/04, A61K 31/55, A61P 35/00, (13) B**
43/00

(21) 1-2012-01569

(22) 06.08.2010

(86) PCT/EP2010/061518 06.08.2010

(87) WO2011/054553 12.05.2011

(30) 0919433.3 05.11.2009 GB

1010509.6 22.06.2010 GB

(45) 27.01.2020 382

(43) 25.11.2013 308

(73) GLAXOSMITHKLINE LLC (US)

2711 Centerville Road, Suite 400, Wilmington Delaware 19808, United States of America

(72) GOSMINI, Romain Luc Marie (FR), MIRGUET, Olivier (FR)

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) **HỢP CHẤT BENZODIAZEPIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất benzodiazepin, quy trình điều chế và dược phẩm chứa hợp chất này để điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất benzodiazepin, quy trình bào chế và dược phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ gen của sinh vật tế bào có nhân điển hình được tổ chức chặt chẽ trong nhân tế bào. Sợi ADN xoắn kép dài được gói xung quanh một octome protein histon (thường bao gồm hai bản sao của các histon H2A, H2B H3 và H4) để tạo thành một nucleosome. Sau đó, đơn vị cơ bản này sẽ được nén hơn nữa nhờ quá trình kết hợp và gấp nếp các nucleosome để tạo thành cấu trúc nhiễm sắc được ngưng tụ cao. Có thể có rất nhiều trạng thái ngưng tụ, và độ chặt của cấu trúc này có thể thay đổi trong chu trình tế bào, và là chặt nhất trong quá trình phân chia tế bào. Cấu trúc nhiễm sắc đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa quá trình phiên mã của gen, quá trình này có thể diễn ra một cách không hiệu quả do cấu trúc nhiễm sắc có mức độ ngưng tụ quá cao. Cấu trúc nhiễm sắc được kiểm soát bởi một loạt các biến đổi sau dịch mã đối với protein histon, đặc biệt là histon H3 và H4, và phổ biến nhất là trong đuôi histon mở rộng từ cấu trúc nucleosome lõi. Các biến đổi này bao gồm axetyl hóa, metyl hóa, phosphoryl hóa, ubiquitin hóa và SUMO hóa. Các chỉ thị ngoại di truyền này được tạo ra và loại bỏ bởi các enzym đặc hiệu, các enzym này sẽ đặt các đuôi lên các gốc đặc hiệu trong đuôi histon, nhờ đó tạo thành mã ngoại di truyền, sau đó mã này sẽ được phiên giải bởi tế bào để có thể điều hòa đặc hiệu gen các cấu trúc nhiễm sắc và do đó có thể điều hòa quá trình phiên mã.

Hầu hết quá trình axetyl hóa histon thường đi kèm với quá trình hoạt hóa phiên mã của gen, vì quá trình biến đổi này sẽ làm lỏng lẻo tương tác của ADN và histon octome nhờ thay đổi lực tĩnh điện. Ngoài sự thay đổi vật lý này, các protein đặc hiệu sẽ liên kết với gốc lyzin được axetyl hóa trong histon để đọc mã ngoại di truyền. Các vùng chức năng bromodomain là những vùng chức năng riêng biệt có kích thước nhỏ (~110 axit amin) trong protein liên kết với lyzin được axetyl hóa thường có nhưng không phải là chỉ có trong histon. Có một họ khoảng 50 protein đã biết là có bromodomain, và chúng có một số chức năng trong tế bào.

Họ protein chứa bromodomain Bet bao gồm 4 protein (BRD2, BRD3, BRD4 và BRD-t) chứa hai bromodomain nối nhau có khả năng liên kết với hai lyzin được axetyl hóa nằm ở gần nhau trong không gian, sẽ gia tăng độ đặc hiệu của tương tác này. BRD2 và BRD3 được báo cáo là đi kèm với histon dọc theo gen được phiên mã hoạt động và có thể có vai trò hỗ trợ quá trình kéo dài bản phiên mã (Leroy et al, *mol. Cell.* 2008 30(1):51-60), trong khi đó BRD4 có vẻ như có liên quan trong quá trình bổ sung phức hệ pTEF-B vào các gen có thể kích hoạt được, gây ra quá trình phosphoryl hóa ARN polymeraza và gia tăng số lượng bản sao phiên mã (Hargreaves et al, *Cell*, 2009 138(1): 129-145). Cũng đã được báo cáo là BRD4 và BRD3 dùng hợp với NUT (protein nhân trong tinh hoàn) tạo thành một gen gây ung thư dung hợp mới, BRD4-NUT, trong dạng ung thư biểu mô ác tính (French et al. *Cancer Research*, 2003, 63, 304-307 và French et al. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, 22 (20), 4135-4139). Số liệu cho thấy protein dung hợp BRD-NUT có vai trò trong quá trình gây ung thư (*Oncogene*, 2008, 27, 2237-2242). BRD-t được biểu hiện duy nhất ở tinh hoàn và buồng trứng. Tất cả các thành viên trong họ này đều đã được báo cáo là có một số chức năng trong kiểm soát hoặc điều khiển chu trình tế bào, và đã được chỉ ra là tồn tại ở dạng phức hệ với nhiễm sắc thể trong quá trình phân chia tế bào – cho thấy vai trò trong việc suy trì trí nhớ ngoại di truyền. Ngoài ra một số virus còn sử dụng các protein này để kết nối hệ gen của chúng với chất nhiễm sắc của tế bào chủ, như một phần của quá trình sao chép virus (You et al *Cell*, 2004 117(3):349-60).

Đơn patent Nhật Bản JP2008-156311 đề cập đến dẫn xuất benzimidazol được cho là hợp chất liên kết với BRD2 bromodomain có ích trong quá trình lây nhiễm/tăng sinh virus.

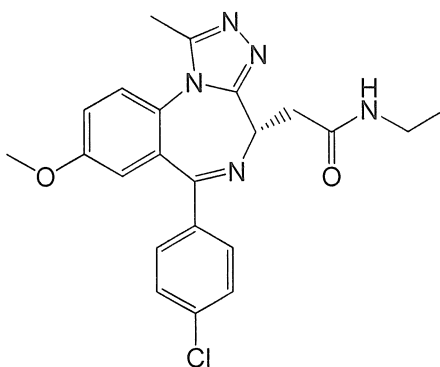
Đơn patent WO2009/084693A1 đề cập đến dẫn xuất thienotriazolodiazepien được cho là ức chế quá trình liên kết giữa histon được axetyl hóa và protein chứa bromodomain được cho là hữu dụng làm hoạt chất chống ung thư.

Hợp chất đã được phát hiện có khả năng ức chế quá trình liên kết của bromodomain với protein được axetyl hóa cùng gốc của nó, cụ thể hơn hợp chất này ức chế quá trình liên kết của bromodomain thuộc họ Bet với lyzin được axetyl hóa. Hợp chất này sau đây sẽ được gọi là “chất ức chế bromodomain”.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất benzodiazepin và dược phẩm chứa hợp chất này để điều trị bệnh.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I):



(I)

hoặc muối của nó.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

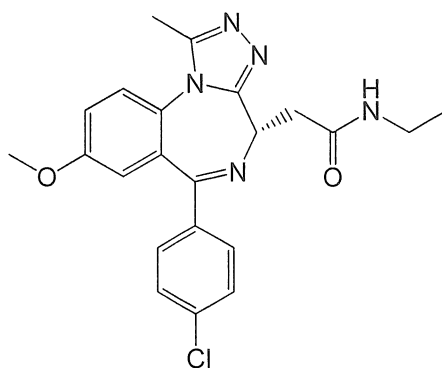
Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó để điều trị, cụ thể là trong điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng, trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định ở đối tượng cần bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả điều trị hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó trong quá trình sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) là 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamit



(I)

hoặc muối của nó.

Có thể hiểu rằng sáng chế đề cập đến tất cả các hợp chất có công thức (I) ở dạng bazơ tự do và muối của chúng, chẳng hạn muối được dùng của nó.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất là 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamit.

Vì tính hữu ích tiềm năng của các hợp chất này trong dược phẩm, nên muối của hợp chất có công thức (I) ở dạng dược dụng. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất là 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamit hoặc muối được dụng của nó.

Muối dược dụng thích hợp bao gồm muối cộng axit hoặc bazơ. Để đánh giá về các muối phù hợp thì xem Berge et al., J. Pharm. Sci., 66:1-19, (1977). Thông thường, muối dược dụng có thể được bào chế bằng cách sử dụng axit hoặc bazơ mong muốn. Muối tạo thành có thể kết tủa từ dung dịch và thu lại bằng cách lọc hoặc có thể được khôi phục bằng cách làm bay hơi dung môi.

Muối cộng bazơ dược dụng có thể được tạo thành từ phản ứng của hợp chất có công thức (I) với một bazơ hữu cơ hoặc vô cơ thích hợp, (chẳng hạn trietylamin, etanolamin, trietanolamin, cholin, arginin, lyzin hoặc histidin), tùy ý trong dung môi, để tạo ra muối cộng bazơ thường được phân lập, chẳng hạn, bằng phương pháp kết tinh và lọc. Muối bazơ dược dụng bao gồm muối amoni, muối kim loại kiềm như natri và kali, kim loại kiềm thổ như canxi và magie và muối với các bazơ hữu cơ, bao gồm

muối của amin bậc 1, bậc 2, bậc 3, như isopropylamin, diethylamin, etanolamin, trimethylamin, dicyclohexyl amin và N-metyl-D-glucamin.

Muối cộng axit được dụng có thể được tạo ra từ phản ứng của hợp chất có công thức (I) với một axit vô cơ hoặc hữu cơ thích hợp (như hydrobromic, hydrocloric, sulphuric, nitric, phosphoric, succinic, maleic, axetic, propionic, fumaric, xitric, tartaric, lactic, benzoic, salixylic, glutamaic, aspartic, p-toluensulfonic, benzensulfonic, metansulfonic, etansulfonic, naphtalensulfonic như 2-naphtalensulfonic, hoặc axit hexanoic), tùy ý trong dung môi thích hợp như dung môi hữu cơ, để tạo ra muối thường được phân lập bằng cách kết tinh và lọc, chẳng hạn. Muối cộng axit được dụng của hợp chất có công thức (I) có thể bao gồm hoặc là, chẳng hạn, hydrobromua, hydroclorua, sulfat, nitrat, phosphat, succinat, maleat, axetat, propionat, fumarat, xitrat, tartrat, lactat, benzoat, salicylat, glutamat, aspartat, p-toluensulfonat, benzensulfonat, metansulfonat, etansulfonat, naphtalensulfonat (chẳng hạn 2-naphtalensulfonat) hoặc muối hexanoat.

Các muối không được dụng khác, chẳng hạn format, oxalat hoặc trifloaxetat, có thể được sử dụng, chẳng hạn, trong quá trình phân lập hợp chất có công thức (I), và cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến tất cả các dạng hóa học lượng pháp và không lượng pháp của muối của hợp chất có công thức (I).

Có thể hiểu rằng nhiều hợp chất hữu cơ có thể tạo thành phức hệ với dung môi trong đó xảy ra phản ứng hoặc hợp chất được kết tủa hoặc kết tinh từ dung môi đó. Các phức hệ này được gọi là “solvat”. Chẳng hạn, phức hệ với nước được gọi là “hydrat”. Dung môi có điểm sôi cao và/hoặc có khả năng tạo liên kết hydro như nước, xylen, N-metyl pyrrolidinon, metanol và etanol có thể được sử dụng để tạo thành solvat. Phương pháp xác định solvat bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, NMR và vi phân tích. Solvat của hợp chất có công thức (I) cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến tất cả các dạng hóa học lượng pháp và không lượng pháp của solvat của hợp chất có công thức (I).

Sáng chế cũng đề cập đến tất cả các loại tiền dược chất của hợp chất có công thức (I) và muối được dụng của chúng, là những hoạt chất sau khi sử dụng có khả năng tạo ra (trực tiếp hoặc gián tiếp) hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó,

hoặc một chất chuyển hóa hoạt động hoặc phần dư của chúng. Các dẫn xuất này là có thể nhận biết được đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, mà không cần một quá trình thử nghiệm không cần thiết nào. Tuy nhiên, có thể tham khảo tài liệu Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th Edition, Vol 1: Principles and Practice.

Hợp chất có công thức (I) có thể ở dạng kết tinh hoặc vô định hình. Hơn nữa, một số dạng kết tinh của hợp chất có công thức (I) có thể tồn tại ở dạng đa hình, cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Dạng đa hình của hợp chất có công thức (I) có thể được xác định và phân biệt sử dụng một số phương pháp phân tích thường quy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhiễu xạ tia X (XRPD), quang phổ hồng ngoại (IR), quang phổ Raman, đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC), phân tích nhiệt trọng trường (TGA) và cộng hưởng từ hạt nhân trạng thái rắn (SSNMR).

Hợp chất có công thức (I) là một đồng phân riêng biệt được phân lập gần như không lẫn các đồng phân khác (nghĩa là tinh khiết về mặt đồng phân đối hình) sao cho có ít hơn 10%, cụ thể là ít hơn khoảng 1%, chẳng hạn ít hơn khoảng 0,1% đồng phân đối hình khác.

Việc phân tách đồng phân có thể thực hiện được bằng các phương pháp thường quy đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn bằng phương pháp kết tinh phân đoạn, sắc ký hoặc HPLC.

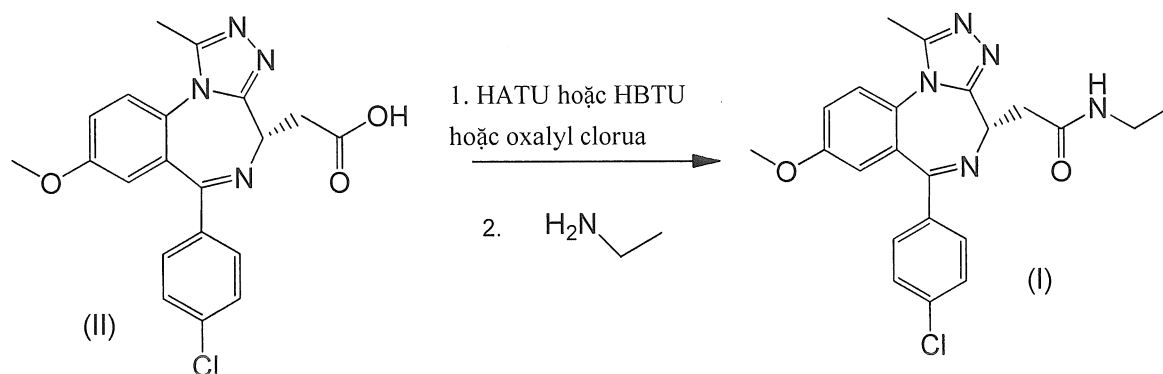
Hợp chất có công thức (I) có thể tồn tại ở một trong nhiều dạng đồng phân hỗn biến. Có thể hiểu rằng sáng chế đề cập đến tất cả dạng đồng phân hỗn biến của hợp chất có công thức (I) ở dạng các đồng phân hỗn biến riêng biệt hoặc hỗn hợp của chúng.

Có thể hiểu rằng sáng chế đề cập đến dạng solvat, đồng phân và dạng đa hình của hợp chất có công thức (I) và muối của chúng.

Hợp chất có công thức (I) và muối được dựng của chúng có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp khác nhau, bao gồm các phương pháp hóa học tiêu chuẩn. Các phương pháp tổng hợp mới chung được nêu dưới đây và sau đó hợp chất có công thức (I) cụ thể sẽ được bào chế trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Các quy trình này sẽ là các khía cạnh khác của sáng chế.

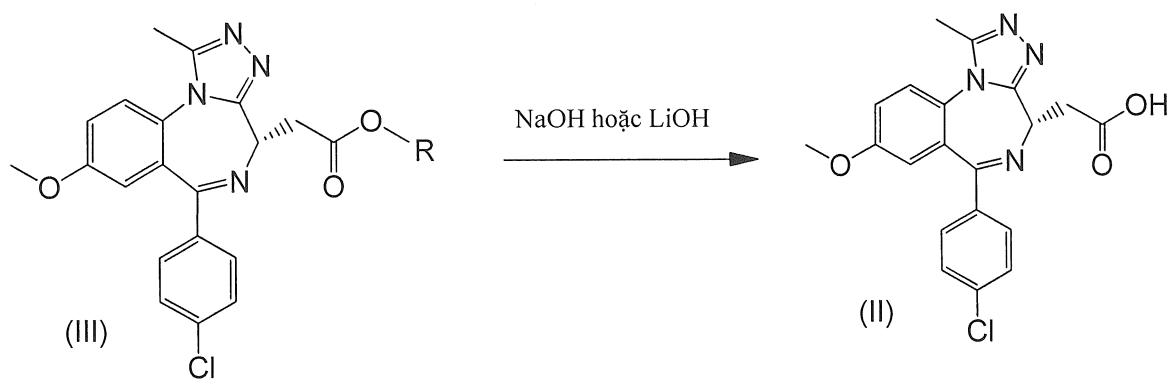
Hợp chất có công thức (I) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 1 bằng cách cho hợp chất có công thức (II) phản ứng với EtNH₂ khi có mặt HATU hoặc HBTU và DIEA ở nhiệt độ phòng. Theo cách khác hợp chất có công thức (I) có thể được bào chế bằng cách cho hợp chất có công thức (II) phản ứng với oxalyl clorua sau đó là thêm EtNH₂ khi có mặt triethylamin.

Sơ đồ phản ứng 1



Hợp chất có công thức (II) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 2. Điều kiện phản ứng thích hợp bao gồm cho hợp chất có công thức (III) phản ứng với hydroxit kiềm tốt hơn là natri hydroxit hoặc lithi hydroxit.

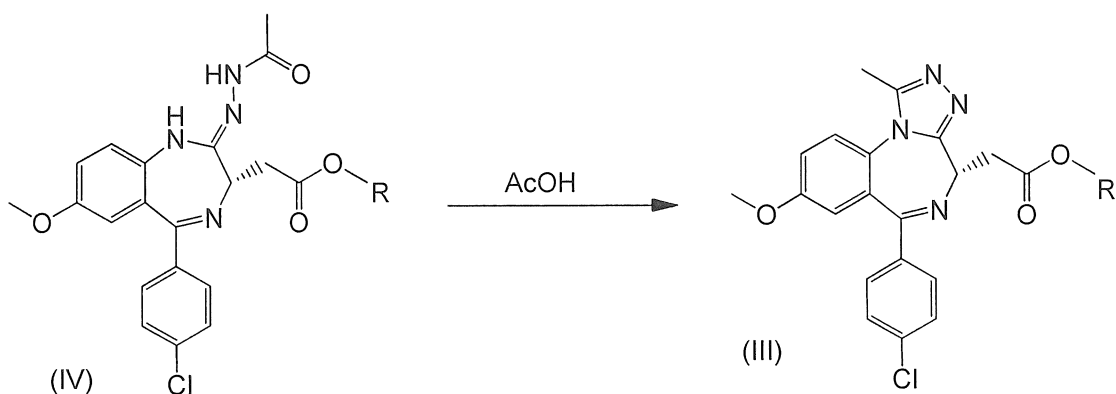
Sơ đồ phản ứng 2



trong đó R là C₁₋₆alkyl như metyl.

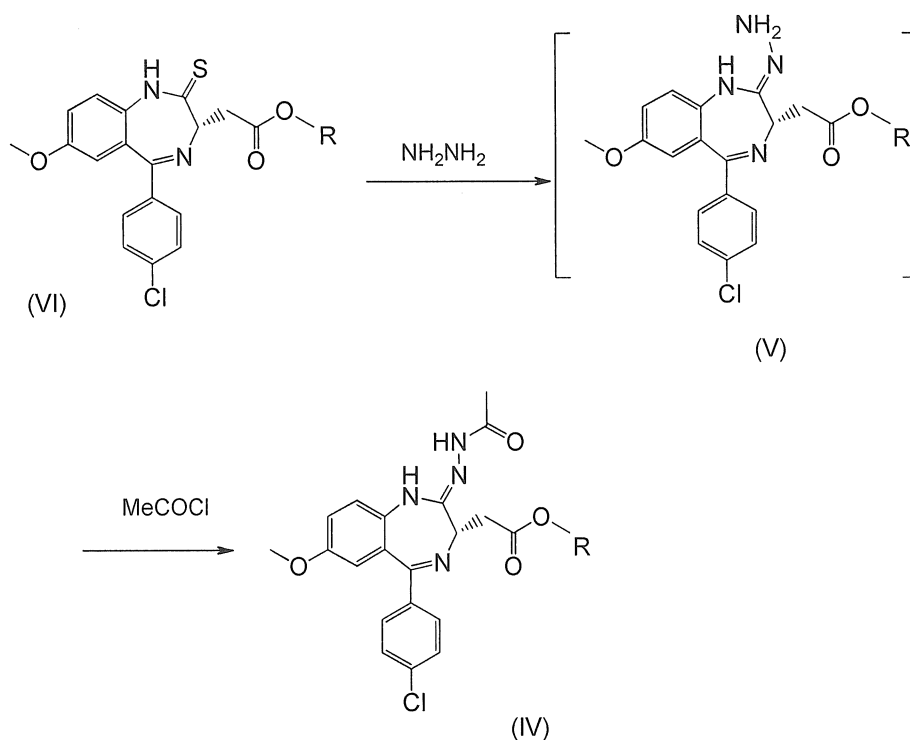
Hợp chất có công thức (III), có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 3 bằng cách cho hợp chất có công thức (IV) phản ứng với AcOH.

Sơ đồ phản ứng 3



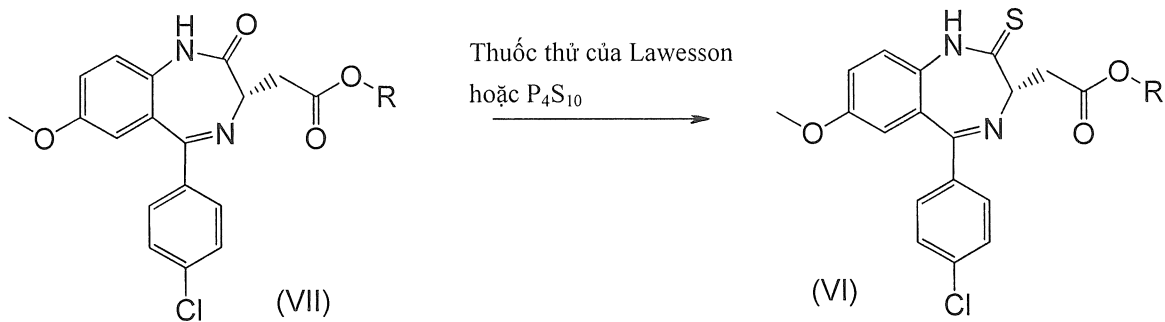
Hợp chất có công thức (IV) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 4 bằng cách cho hợp chất có công thức (VI) phản ứng với hydrazin ở nhiệt độ dưới 15°C sau đó là phản ứng của hydrazon tạo thành (V) với MeCOCl ở 0°C. Thông thường, hydrazon (V) sẽ được sử dụng mà không cần tinh chế thêm và được cho phản ứng với MeCOCl ở, chẳng hạn 0°C.

Sơ đồ phản ứng 4



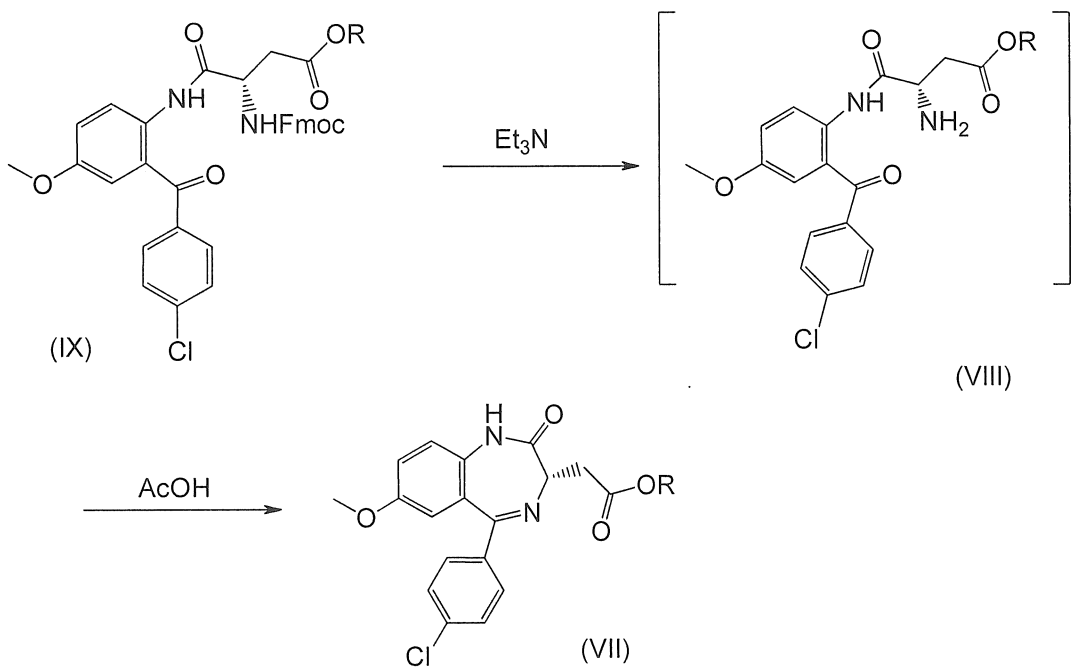
Hợp chất có công thức (VI) trong đó R là C₁₋₆alkyl (như metyl) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 5 từ hợp chất có công thức (VII) bằng cách xử lý với hóa chất Lawesson hoặc P₄S₁₀. Điều kiện phản ứng thích hợp bao gồm cho hợp chất có công thức (VIII) phản ứng với P₄S₁₀ trong 1,2-dicloetan ở, chẳng hạn 70°C.

Sơ đồ phản ứng 5



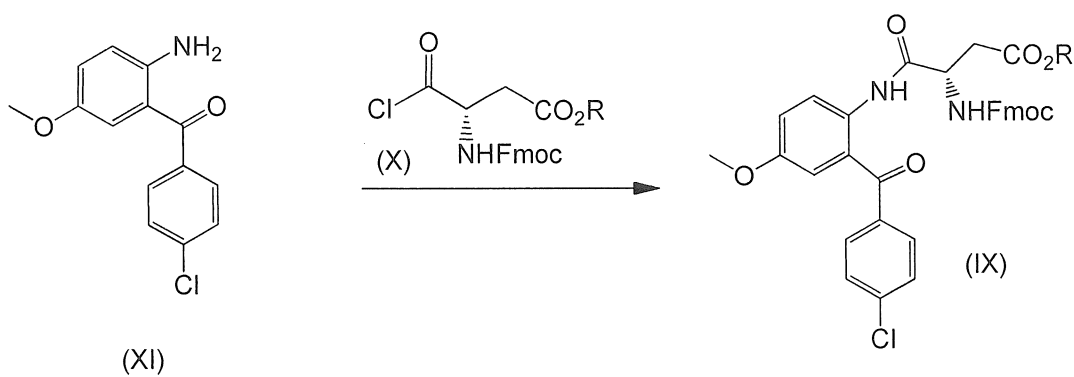
Hợp chất có công thức (VII) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 6, bằng cách cho hợp chất có công thức (IX) phản ứng với bazơ hữu cơ như trietylamin sau đó là cho amin tạo thành (VIII) phản ứng với axit axetic. Thông thường, amin (VIII) sẽ được sử dụng mà không cần tinh chế thêm và được cho phản ứng với AcOH ở, chẳng hạn 60°C.

Sơ đồ phản ứng 6



Hợp chất có công thức (IX) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 7, bằng cách cho hợp chất có công thức (XI) phản ứng với axylclorua (X) thu được từ axit aspartic được bảo vệ.

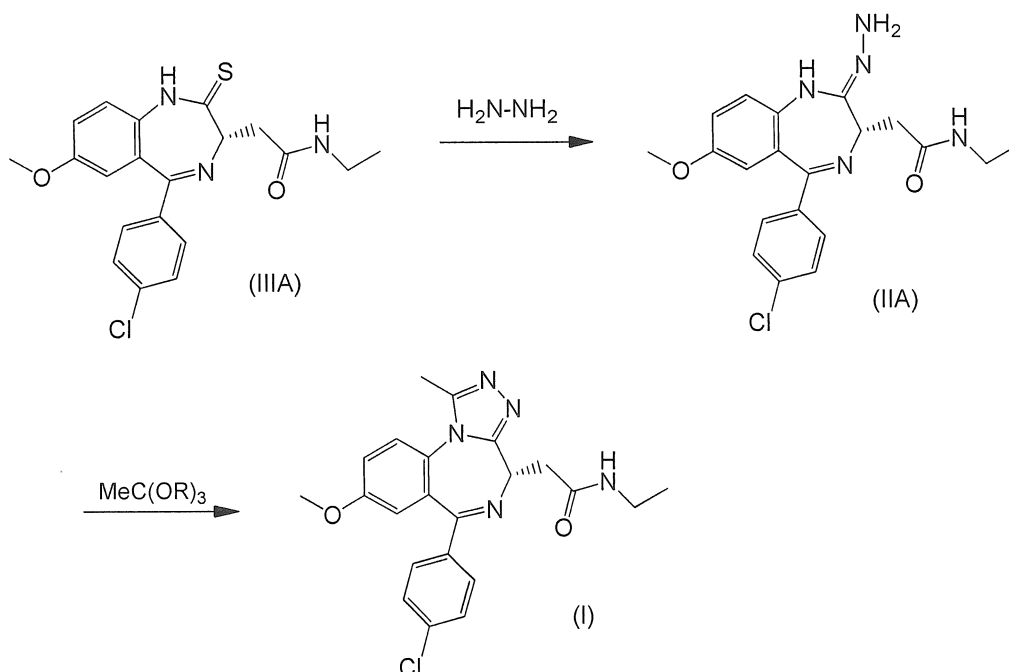
Sơ đồ phản ứng 7



Hợp chất có công thức (XI) có thể được bào chế theo quy trình được mô tả trong tài liệu Synthesis 1980, 677-688. Axyl clorua có công thức (X) có thể được bào chế theo quy trình được mô tả trong J. Org. Chem., 1990, 55, 3068-3074 và J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2001, 1673-1695.

Theo cách khác hợp chất có công thức (I) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 8.

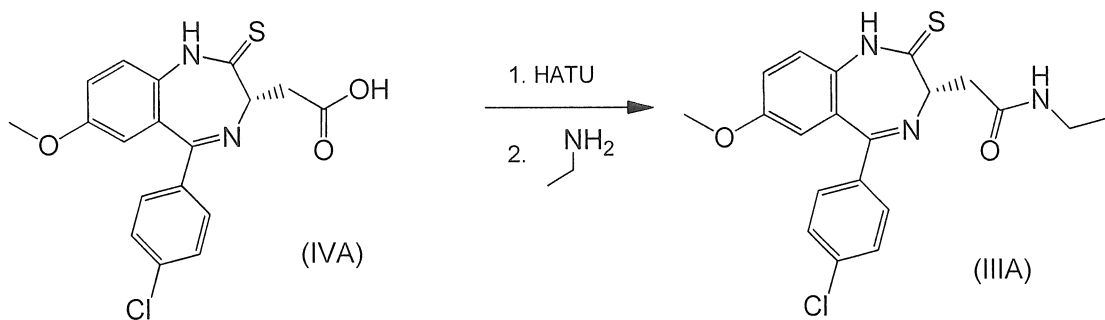
Sơ đồ phản ứng 8



trong đó R là C₁₋₄alkyl như methyl.

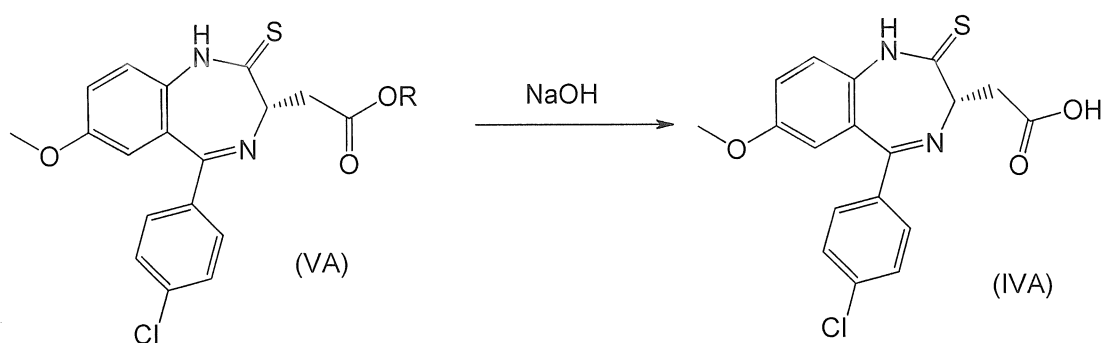
Hợp chất có công thức (IIIA) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 9 bằng cách cho hợp chất có công thức (IVA) phản ứng với EtNH₂ khi có mặt HATU và DIEA, chẳng hạn ở nhiệt độ phòng.

Sơ đồ phản ứng 9



Hợp chất có công thức (IVA) có thể được bào chế theo sơ đồ phản ứng 10. Điều kiện phản ứng thích hợp bao gồm cho hợp chất có công thức (VI) phản ứng với hydroxit kiềm như natri hydroxit.

Sơ đồ phản ứng 10



Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng sẽ là có lợi nếu bảo vệ một hoặc nhiều nhóm chức của hợp chất được đề cập trong các quy trình trên. Ví dụ về các nhóm bảo vệ và cách để tách chúng có thể được tìm thấy trong tài liệu T. W. Green 'Protective Groups in Organic Synthesis' (4th edition, J. Wiley và Sons, 2006). Các nhóm bảo vệ amin thích hợp bao gồm axyl (chẳng hạn axetyl, carbamat (chẳng hạn 2',2',2'-trichloetoxycarbonyl, benzyloxycarbonyl hoặc t-butoxycarbonyl) và arylalkyl (chẳng hạn benzyl), có thể được loại bỏ bằng phương pháp thủy phân (chẳng hạn sử dụng axit như axit hydrocloric trong dioxan hoặc axit trifloaxetic trong diclometan) hoặc bằng phương pháp khử (chẳng hạn phân giải hydro nhóm benzyl hoặc benzyloxycarbonyl hoặc tách khử nhóm 2',2',2'-trichloetoxycarbonyl sử dụng kẽm trong axit axetic). Các nhóm bảo vệ amin thích hợp khác bao gồm trifloaxetyl (-COCF₃) có thể được loại bỏ bằng phản ứng thủy phân được xúc tác bằng bazơ.

Có thể hiểu rằng trong bất kỳ một con đường nêu trên, trật tự chính xác của các bước tổng hợp nhờ đó các nhóm và gốc khác nhau được đưa vào phân tử có thể bị thay

đổi. Một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể đảm bảo rằng các gốc hoặc nhóm được đưa vào ở một giai đoạn của quy trình sẽ không bị ảnh hưởng bởi các bước biến đổi và phản ứng tiếp theo, và do đó có tùy chọn trình tự của các bước tổng.

Một số hợp chất trung gian nêu trên được cho là mới và do đó sẽ là một khía cạnh của sáng chế.

Hợp chất có công thức (I) và muối của chúng là chất ức chế bromodomain, và do đó được cho là có tiềm năng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó hợp chất bromodomain được chỉ định.

Do đó, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị. Hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó có thể được sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định.

Theo một phương án sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh tự miễn và/hoặc viêm mãn tính. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị ung thư, như cacxinom nội tạng.

Theo một phương án sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó trong quá trình sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó trong quá trình sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc viêm mãn tính. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó trong quá trình sản xuất dược phẩm để điều trị ung thư, như cacxinom nội tạng.

Theo một phương án sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng, trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định, ở đối tượng cần bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả điều trị hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh tự miễn và/hoặc viêm mãn tính, ở đối tượng cần bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả điều

trị của hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị ung thư, như cacxinom nội tạng, ở đối tượng cần bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả điều trị hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, đối tượng là động vật có vú, đặc biệt là người.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “lượng có hiệu quả” có nghĩa là lượng được chất hoặc thuốc sẽ tạo ra đáp ứng sinh học học y học của mô, cơ quan, động vật hoặc người được phát hiện bởi nhà nghiên cứu hoặc nhà lâm sàng. Hơn nữa, thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” có nghĩa là một lượng bất kỳ, so với đối tượng tương ứng khi chưa nhận được lượng này, sẽ tạo ra phương pháp điều trị được cải thiện, làm lành vết thương, ngăn ngừa, hoặc giảm nhẹ bệnh, rối loạn, hoặc tác dụng phụ, hoặc giảm tốc độ tiến triển của bệnh hoặc rối loạn. Thuật ngữ này cũng dùng để chỉ lượng hiệu quả để gia tăng chức năng sinh lý bình thường.

Chất ức chế bromodomain được cho là hữu dụng trong điều trị rất nhiều bệnh hoặc tình trạng liên quan đến quá trình viêm tổ chức hoặc toàn thân, đáp ứng viêm với quá trình lây nhiễm hoặc sự giảm oxy huyết, quá trình hoạt hóa và tăng sinh tế bào, chuyển hóa mỡ, xơ hóa và trong ngăn ngừa và điều trị nhiễm virus.

Chất ức chế bromodomain cũng có thể hữu dụng trong điều trị một loạt các bệnh tự miễn mãn tính và tình trạng viêm như viêm khớp dạng thấp, viêm xương khớp, gut mãn tính, vảy nến, luput ban đỏ toàn thân, xơ cứng rải rác, bệnh viêm ruột (bệnh Crohn và viêm ruột loét), hen, bệnh tắc khí quản mãn tính, viêm phổi, viêm cơ tim, viêm màng ngoài tim, viêm cơ, eczema, viêm da, rụng tóc, bệnh bạch biến, bệnh da bong nước, viêm thận, viêm mạch, xơ vữa động mạch, bệnh Alzheimer, trầm cảm, viêm võng mạc, viêm màng mạch nhỏ, viêm củng mạc, viêm gan, viêm tụy, xơ ống mật nguyên phát, xơ ống gan nguyên phát, bệnh Addison, viêm tuyến yên, viêm tuyến giáp, đái tháo đường typ I và thải ghép cấp tính.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong điều trị một loạt tình trạng viêm cấp tính như gút cấp tính, viêm động mạch tế bào khổng lồ, viêm thận bao gồm viêm thận luput, viêm mạch với sự tham gia của cá nóc quan như viêm tiểu cầu thận, viêm mạch bao gồm viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh u hạt Wegener,

Polyarteritis nodosa, bệnh Behcet, bệnh Kawasaki, viêm động mạch Takayasu và thải ghép cấp tính.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng liên quan đến đáp ứng viêm với quá trình lây nhiễm vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng hoặc độc tố của chúng, như nhiễm trùng huyết, hội chứng nhiễm trùng huyết, sốc nhiễm khuẩn, nhiễm nội độc tố, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (hội chứng đáp ứng viêm toàn thân - SIRS), hội chứng suy đa phủ tạng, hội chứng sốc do nhiễm độc tố, tổn thương phổi cấp tính, ARDS (hội chứng suy hô hấp ở người trưởng thành), suy thận cấp tính, viêm gan bạo phát, bong, viêm tụy cấp, hội chứng sau phẫu thuật, bệnh sarcoid, phản ứng Herxheimer, viêm não, viêm tủy, viêm màng não, sốt rét, SIRS đi kèm với nhiễm virus như cúm, éc-pet, éc-pet đơn và coronavirut.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị tình trạng đi kèm với tổn thương thiếu máu cục bộ-tái tưới máu như nhồi máu cơ tim, xuất huyết mạch máu não (đột quỵ), hội chứng mạch vành cấp tính, tổn thương tái tưới máu thận, ghép tạng, ghép can thiệp mạch vành, thủ thuật can thiệp tim phổi và nghẽn mạch phổi, thận, gan, tiêu hóa hoặc tứ chi.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong điều trị rối loạn chuyển hóa lipid thông qua quá trình điều hòa APO-A1 như tăng cholesterol huyết, xơ vữa động mạch và bệnh Alzheimer.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong điều trị tình trạng xơ hóa như xơ hóa phổi tự phát, xơ hóa thận, hẹp sau phẫu thuật, tình trạng tạo keloid, xơ cứng bì và xơ hóa cơ tim.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong ngăn ngừa và điều trị nhiễm virus như virus herpes, virus gây bệnh u nhú ở người, adenovirut, virus đậu mùa và các loại virus ADN khác.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong điều trị ung thư, bao gồm ung thư huyết (như bệnh bạch cầu), ung thư biểu mô bao gồm cacxinom phổi, vú và đại tràng, cacxinom nội tạng, ung thư trung mô, ung thư gan, thận và thần kinh.

Chất ức chế bromodomain có thể là hữu dụng trong điều trị điều trị chỉ định nhãn khoa như khô mắt.

Theo một phương án bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định được chọn từ bệnh đi kèm với hội chứng đáp ứng viêm toàn thân, như nhiễm trùng huyết, bỏng, viêm tụy, chấn thương nặng, xuất huyết và thiếu máu cục bộ. Theo phương án này, chất ức chế bromodomain sẽ được sử dụng khi chẩn đoán để làm giảm tỷ lệ: SIRS, sốc, hội chứng suy đa phủ tạng, thường bao gồm việc phát triển tổn thương phổi cấp tính, ARDS, tổn thương thận, gan, tim và tiêu hóa cấp tính và tử vong. Theo một phương án khác chất ức chế bromodomain sẽ được sử dụng trước phẫu thuật hoặc các thủ thuật khác đi kèm với nguy cơ nhiễm trùng huyết, xuất huyết, tổn thương mô mở rộng, SIRS hoặc MODS. Theo một phương án cụ thể, bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định là nhiễm trùng huyết, hội chứng nhiễm trùng huyết, sốc nhiễm khuẩn và/hoặc nhiễm nội độc tố. Theo một phương án khác, chất ức chế bromodomain được chỉ định để điều trị viêm tụy cấp hoặc mãn tính. Theo một phương án khác bromodomain được chỉ định để điều trị bỏng.

Theo một phương án bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định được chọn từ nhiễm əc-pet và tái hoạt hóa əc-pet, bệnh əc-pet môi, nhiễm əc-pet, thủy đậu, bệnh zona, virus gây bệnh u nhú ở người, tăng sản cổ tử cung, nhiễm adenovirus, bao gồm bệnh hô hấp cấp tính, và nhiễm virus đậu mùa và virus cúm lợn châu Phi. Theo một phương án cụ thể, chất ức chế bromodomain được chỉ định để điều trị nhiễm virus gây bệnh u nhú ở người trên da hoặc biểu mô cổ tử cung.

Thuật ngữ “bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định”, dùng để chỉ một bệnh bất kỳ nêu trên.

Khi có thể sử dụng trong điều trị, hợp chất có công thức (I) cũng như muối được dụng của chúng có thể được sử dụng như hóa chất thô, thường là hoạt chất ở dạng dược phẩm.

Do đó, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó và một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Do đó, sáng chế đề cập đến dược phẩm để điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó chất ức chế bromodomain được chỉ định chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó.

Chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được sử dụng trong dược phẩm cần phải là dược dụng và tương hợp với các thành phần khác trong dược phẩm và không có hại với người sử dụng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình bào chế dược phẩm bao gồm bước trộn hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của nó, với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Dược phẩm có thể được sử dụng trong điều trị một tình trạng bất kỳ nêu trên.

Vì hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng được sử dụng trong dược phẩm, nên có thể hiểu rằng hợp chất sẽ được cung cấp ở dạng tương đối tinh khiết, chẳng hạn, ít nhất 60% tinh khiết, tốt hơn là ít nhất 75% tinh khiết và tốt nhất là ít nhất 85% tinh khiết, đặc biệt là ít nhất 98% tinh khiết (% theo trọng lượng).

Dược phẩm có thể ở dạng liều đơn vị chứa một lượng định trước hoạt chất trên một liều đơn vị. Dạng liều đơn vị được ưu tiên là dạng liều chứa liều hàng ngày hoặc liều chia, hoặc một tỷ lệ thích hợp hoạt chất. Do đó, liều đơn vị có thể được sử dụng nhiều hơn một lần một ngày. Liều đơn vị được là dạng liều chứa liều hàng ngày hoặc liều chia (để sử dụng nhiều hơn một lần một ngày).

Dược phẩm có thể được sử dụng theo một đường dùng thích hợp bất kỳ, chẳng hạn qua đường miệng (bao gồm đường dưới lưỡi và niêm mạc má), qua trực tràng, xông hít, trong mũi, qua niêm mạc (bao gồm niêm mạc má, dưới lưỡi hoặc qua da), qua âm đạo hoặc ngoài đường tiêu hóa (bao gồm dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch hoặc trong da). Dược phẩm có thể được bào chế bằng một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn bằng cách kết hợp hoạt chất với chất mang hoặc tá dược.

Theo một phương án, dược phẩm được sử dụng qua đường miệng.

Theo một phương án, dược phẩm được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt là theo đường trong tĩnh mạch.

Dược phẩm được sử dụng theo đường ngoài tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng trong nước hoặc trong một dung môi khác nước có thể chứa chất chống oxy hóa, đệm, chất kìm khuẩn và dung môi có thể thay đổi đẳng trương của dược phẩm với máu của đối tượng nhận; và hỗn dịch tiêm vô trùng trong nước và trong dung môi không phải nước có thể bao gồm chất phân tán và chất tạo độ đặc. Dược phẩm có thể ở dạng vật chứa liều đơn vị hoặc vật chứa đa liều, chẳng hạn lọ hoặc ống thuốc được hàn

kín, và có thể được bảo quản ở điều kiện đông khô và chỉ cần thêm chất mang lỏng vô trùng nào, chẳng hạn nước pha tiêm, ngay trước khi sử dụng. Dung dịch và hỗn dịch tiêm ngay có thể được bào chế từ bột, hạt cốm và viên nén vô trùng.

Dược phẩm được sử dụng qua đường miệng có thể ở dạng đơn vị riêng rẽ như viên nang hoặc viên nén; bột hoặc hạt cốm; dung dịch hoặc hỗn dịch trong nước hoặc trong dung môi không phải nước; bột hoặc kem ăn được; hoặc nhũ tương lỏng dầu trong nước hoặc nhũ tương lỏng nước trong dầu.

Chẳng hạn, để sử dụng qua đường miệng ở dạng viên nén hoặc viên nang, thành phần dược chất có thể được kết hợp với chất mang trợ được dụng không độc dùng qua đường miệng như etanol, glyxerol, nước và tương tự. Bột thích hợp để kết hợp vào viên nén hoặc viên nang có thể được bào chế bằng cách nghiền hợp chất đến kích thước mịn thích hợp (chẳng hạn bằng cách micron hóa) và trộn với chất mang được dụng được bào chế theo cách tương tự như carbohydrat ăn được, chẳng hạn như tinh bột hoặc mannitol. Chất tạo hương, chất bảo quản, chất phân tán và chất tạo màu cũng có thể được sử dụng.

Viên nang có thể được tạo ra bằng cách bào chế hỗn hợp bột, như đã nêu, và nhồi vào vỏ nang. Chất gây trượt và chất trơn như colloidal silica, talc, magie stearat, canxi stearat hoặc polyetylen glycol rắn có thể được thêm vào hỗn hợp bột trước khi nhồi. Chất phân tán hoặc hòa tan như aga-aga, canxi cacbonat hoặc natri cacbonat cũng có thể được thêm vào để cải thiện sinh khả dụng của dược phẩm khi viên nang được sử dụng.

Hơn nữa, nếu muốn hoặc nếu cần, chất liên kết, chất gây trượt, chất gây trơn, chất điều vị, hương liệu, chất phân tán và chất tạo màu thích hợp cũng có thể được cho vào hỗn hợp. Chất liên kết thích hợp bao gồm tinh bột, gelatin, đường tự nhiên như glucoza hoặc beta-lactoza, đường ngô, gôm tự nhiên và gôm tổng hợp như acacia, tragacanth hoặc natri alginat, carboxymetylxenluloza, polyetylen glycol, sáp và tương tự. Chất gây trơn được sử dụng trong những dạng liều này bao gồm natri oleat, natri stearat, magie stearat, natri benzoat, natri axetat, natri clorua và tương tự. Chất phân tán bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tinh bột, metyl xenluloza, aga, bentonit, gôm xanthan và tương tự. Viên nén được bào chế, chẳng hạn, bằng cách tạo ra hỗn hợp bột, tạo hạt cốm hoặc nén, thêm chất gây trơn và chất phân tán và ép thành viên

nén. Hỗn hợp bột được bào chế bằng cách trộn hợp chất, có độ tinh khiết chấp nhận được, với chất pha loãng hoặc bazơ nêu trên, và tùy ý, với chất liên kết như carboxymethylxenluloza, aliginat, gelatin, hoặc polyvinyl pyrrolidon, chất bảo vệ dung dịch như paraffin, chất tăng hấp thu như muối bậc bốn và/hoặc chất hấp thu như bentonit, kaolin hoặc dicanxi phosphat. Hỗn hợp bột có thể được tạo viên cốm bằng cách làm ẩm bằng chất liên kết như syrup, tinh bột, acadia mucilage hoặc dung dịch xelluloza hoặc polyme và ép đùn qua sàng. Một phương pháp khác với phương pháp tạo hạt cốm, hỗn hợp bột có thể được cho chạy qua máy tạo viên nén và kết quả là hạt được hình thành chưa hoàn toàn sẽ bị vỡ thành hạt cốm. Hạt cốm có thể được làm trơn để ngăn sự dính vào khuôn tạo viên nén bằng cách thêm axit stearic, muối stearat, talc hoặc dầu khoáng. Hỗn hợp được làm trơn sẽ được nén thành viên nén. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được kết hợp với chất mang trơn trơn chảy và nén thành viên nén trực tiếp mà không cần qua công đoạn tạo hạt cốm. Lớp bao bảo vệ trong suốt hoặc cản quang bao gồm lớp bap sen-lắc, lớp bao đường hoặc vật liệu polyme và lớp bao đánh bóng là sáp. Thuốc nhuộm có thể được thêm vào các lớp bao này để phân biệt các liều đơn vị khác nhau.

Dịch lỏng dùng qua đường miệng như dung dịch, xi-rô và cồn thuốc có thể được tạo ra ở dạng đơn vị liều sao cho một lượng xác định của đơn vị liều sẽ chứa lượng định trước của hợp chất. Xi-rô có thể được tạo ra bằng cách hòa tan hợp chất trong dung dịch được tạo mùi thơm một cách thích hợp, cồn thuốc được bào chế bằng cách sử dụng chất dẫn thuốc cơ bản chất là cồn không độc. Hỗn dịch có thể được bào chế bằng cách phân tán hợp chất trong chất dẫn thuốc không độc. Chất hòa tan và chất nhũ hóa như cồn isostearyl etoxy hóa và polyoxy etylen sorbitol ete, chất bảo quản, hương liệu như dầu bạc hà hoặc chất điều vị tự nhiên hoặc saccharin hoặc các chất điều vị nhân tạo khác, và các chất tương tự cũng có thể được sử dụng.

Khi thích hợp, dược phẩm đơn vị liều để sử dụng qua đường miệng có thể được vi nang hóa. Dược phẩm cũng có thể được bào chế để kéo dài hoặc duy trì quá trình giải phóng chẳng hạn bằng cách bao tiểu phần trong vật liệu polyme, sáp hoặc các vật liệu tương tự.

Hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng cũng có thể được sử dụng ở dạng hệ phân phối liposom, như không bào một ngăn nhỏ, không bào một ngăn

lớn và không bào nhiều ngăn. Liposom cũng có thể được tạo ra từ nhiều loại phospholipit, như cholesterol, stearylamin hoặc phosphatidylcholin.

Dược phẩm được sử dụng tại chỗ có thể được bào chế ở dạng thuốc mỡ, kem, hỗn dịch, kem dưỡng da, bột, dung dịch, bột nhào, gel, chế phẩm dạng xịt, sol khí hoặc dầu.

Để điều trị mắt hoặc các tổ chức niêm mạc khác, chẳng hạn miệng và da, được phẩm thường được sử dụng ở dạng thuốc mỡ hoặc kem bôi tại chỗ. Khi được bào chế thành dạng thuốc mỡ, hoạt chất có thể được sử dụng với gốc mỡ hòa tan trong nước hoặc parafin. Theo cách khác, hoạt chất có thể được bào chế trong kem với gốc kem dầu trong nước hoặc nước trong dầu.

Dược phẩm sử dụng tại chỗ qua mắt bao gồm chế phẩm nhỏ mắt trong đó hoạt chất được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang thích hợp, đặc biệt là dung môi nước.

Dạng liều để sử dụng theo đường mũi hoặc xông hít có thể được bào chế ở dạng sol khí, dung dịch, hỗn dịch, gel hoặc bột khô.

Đối với dược phẩm thích hợp và/hoặc được sử dụng qua đường xông hít, được ưu tiên là hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dùng của nó ở dạng giảm kích thước tiểu phần chẳng hạn thu được bằng cách micron hóa. Kích thước tiểu phần được ưu tiên của hợp chất hoặc muối có kích thước tiểu phần giảm (chẳng hạn được micron hóa) được xác định giá trị D50 là khoảng 0,5 đến khoảng 10 micron (chẳng hạn được đo bằng phương pháp tán xạ laze).

Chế phẩm sol khí, chẳng hạn để sử dụng qua đường xông hít, có thể chứa dung dịch hoặc hỗn dịch mịn của hoạt chất trong dung môi được dùng. Dạng bào chế sol khí có thể được trình bày ở dạng liều đơn hoặc đa liều trong vật chứa được hàn kín, có thể là một ống thuốc hoặc dạng ống thuốc thay thế để sử dụng với thiết bị khí dung hoặc thiết bị xông hít. Theo cách khác, vật chứa được hàn kín có thể là thiết bị phân tán đơn vị như thiết bị xông hít đơn liều hoặc thiết bị phân tán sol khí được lắp van định liều (thiết bị xông hít định liều).

Nếu dạng liều chứa chất phân tán sol khí, nó sẽ chứa một chất đẩy thích hợp như khí nén, carbon dioxit hoặc chất đẩy hữu cơ như hydroflocarbon (HFC). Chất đẩy HFC thích hợp bao gồm 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropan và 1,1,1,2-tetrafluoetan. Dạng liều

sol khí cũng có thể ở dạng bình xịt dạng bơm. Sol khí điều áp có thể chứa dung dịch hoặc hỗn dịch hoạt chất. Dạng bào chế này có thể cần phải kết hợp tá dược chẳng hạn, đồng dung môi và/hoặc chất hoạt động bề mặt để cải thiện đặc tính phân tán và độ đồng nhất của dạng bào chế hỗn dịch. Dạng bào chế dung dịch có thể cần phải thêm đồng dung môi như etanol.

Đối với dược phẩm thích hợp và/hoặc được bào chế để sử dụng qua đường xông hít, dược phẩm có thể ở dạng dược phẩm bột khô có khả năng xông hít. Dược phẩm này có thể chứa bột như lactoza, glucoza, trehaloza, mannitol hoặc tinh bột, hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó (tốt hơn là ở dạng kích thước tiểu phần giảm, chẳng hạn ở dạng được micro hóa), và tùy ý một chất điều biến đặc điểm như L-leuxin hoặc axit amin khác và/hoặc muối ki loại của axit stearic như magie hoặc canxi stearat. Tốt hơn là, dược phẩm xông hít dạng bột khô chứa hỗn hợp bột khô gồm có lactoza chẳng hạn lactoza monohydrat và hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó. Dược phẩm này có thể được sử dụng cho bệnh nhân sử dụng thiết bị thích hợp như thiết bị DISKUS[®], được phân phối bởi GlaxoSmithKline chẳng hạn, được mô tả trong tài liệu GB 2242134 A.

Hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng có thể được bào chế ở dạng bào chế lỏng để phân phối từ thiết bị phân phối dịch lỏng, chẳng hạn thiết bị phân phối dịch lỏng có vòi phun qua đó một lượng xác định dạng bào chế lỏng sẽ được phân tán sau khi áp dụng một lực vào cơ chế đẩy của thiết bị phân phối dịch lỏng. Các thiết bị phân phối dịch lỏng thông thường được cung cấp với một khoang chứa nhiều liều định trước của dạng bào chế lỏng, liều lượng có thể phân tán được sau khi đẩy. Vòi phun có thể được thiết kế để vừa với lỗ mũi của người sử dụng để phân phối kiểu xịt dịch lỏng vào khoang mũi. Thiết bị phân phối dịch lỏng được mô tả trong tài liệu WO2005/044354 A1.

Lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố bao gồm, chẳng hạn, tuổi và thể trọng của đối tượng, tình trạng cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của nó, bản chất của dạng bào chế, và đường dùng, và cuối cùng là theo ý kiến của bác sĩ. Trong dược phẩm, mỗi đơn vị liều để sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa thường chứa từ 0,01 đến 3000mg, tốt hơn là 0,5 đến 1000mg hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược

dụng của nó được tính theo bazơ tự do. Mỗi đơn vị liều để sử dụng qua đường mũi hoặc xông hít thường chứa từ 0,001 đến 50mg, tốt hơn là 0,01 đến 5mg hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó, được tính theo bazơ tự do.

Hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng có thể được sử dụng theo liều hàng ngày (cho bệnh nhân lớn), chẳng hạn, liều dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa từ 0,01mg đến 3000mg một ngày hoặc 0,5 đến 1000mg một ngày, hoặc liều dùng qua đường mũi hoặc xông hít từ 0,001 đến 50mg một ngày hoặc 0,01 đến 5mg một ngày hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó, tính theo dạng bazơ tự do. Lượng như vậy có thể là một liều duy nhất một ngày hoặc thông thường là một số liều chia (như hai, ba, bốn, năm hoặc sáu) một ngày sao cho tổng liều hàng ngày là như nhau. Lượng có hiệu quả muối dược dụng của hợp chất, có thể được xác định là tỷ lệ của lượng có hiệu quả của hợp chất có công thức (I).

Do đó, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa (a) hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 3000mg, và (b) một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược dược dụng với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2g.

Hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng có thể được sử dụng riêng biệt hoặc cùng với các hoạt chất điều trị khác. Phép điều trị kết hợp theo sáng chế bao gồm việc sử dụng ít nhất một hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó, và việc sử dụng ít nhất một hoạt chất dược dụng khác. Tốt hơn, nếu phép điều trị kết hợp theo sáng chế bao gồm việc sử dụng ít nhất một hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một hoạt chất điều trị khác. Hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng, và các hoạt chất điều trị khác có thể được sử dụng cùng với nhau trong một dược phẩm hoặc riêng biệt và, khi được sử dụng riêng biệt có thể sử dụng đồng thời hoặc theo thứ tự bất kỳ. Lượng hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng, và hoạt chất điều trị khác và thời gian sử dụng tương đối sẽ được lựa chọn để thu được tác dụng điều trị kết hợp mong muốn. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp bao gồm hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó và ít nhất một hoạt chất điều trị khác. Theo một phương án sáng chế đề cập đến dược phẩm hỗn hợp bao gồm hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó cùng với một hoặc nhiều hoạt chất điều trị khác.

Do đó, theo một khía cạnh, hợp chất có công thức (I) và dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với hoặc bao gồm một hoặc nhiều hoạt chất điều trị khác, chẳng hạn được chọn từ kháng sinh, kháng virus, glucocorticosteroid, chất đối kháng muscarinic và chất chủ vận beta-2.

Có thể hiểu rằng khi hợp chất có công thức (I) và muối được dùng của chúng được sử dụng cùng với các hoạt chất điều trị khác, chúng thường được sử dụng theo đường xông hít, trong tĩnh mạch, qua đường miệng hoặc trong mũi, sao cho dược phẩm có thể được sử dụng theo cùng một đường dùng. Theo cách khác, các thành phần riêng biệt của dược phẩm có thể được sử dụng theo các đường dùng khác nhau.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hỗn hợp bao gồm một hoặc hai hoạt chất điều trị khác.

Sẽ là rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này là, khi cần các hoạt chất điều trị khác có thể được sử dụng ở dạng muối, chẳng hạn muối kim loại kiềm hoặc muối amin hoặc muối cộng axit, hoặc tiền dược chất, hoặc este, chẳng hạn este alkyl thấp, hoặc solvat, chẳng hạn hydrat, để tối ưu hóa hoạt tính và/hoặc độ ổn định và/hoặc các đặc điểm vật lý, như độ tan, của hoạt chất. Tương tự, nếu cần, hoạt chất có thể được sử dụng ở dạng tinh khiết về mặt quang học.

Hỗn hợp nêu trên có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm và do đó sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm hỗn hợp nêu trên cùng với chất pha loãng hoặc chất mang được dùng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hợp chất có công thức (I) có thể được bào chế theo phương pháp nêu dưới đây hoặc bằng phương pháp tương tự. Do đó phần các chất trung gian và ví dụ dưới đây chỉ có mục đích mô tả quy trình bào chế hợp chất có công thức (I) và không được coi là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ một cách nào.

Thông tin thử nghiệm chung

Tất cả nhiệt độ trong phần này đều là °C.

Danh mục viết tắt

TLC - sắc ký lớp mỏng

AcOH	- axit axetic
AcCl	- axetyl clorua
PPTS	- pyridin p-toluensulfonat
DCM	- diclometan
1,2-DCE	- 1,2-dicloetan
DIC	- Diisopropylcarbodiimit
DIEA	- N,N-diisopropyletylamin
DMF	- N,N-dimetylformamit
DMAP	- 4-dimetylaminopyridin
Fmoc	- 9H-floen-9-ylmetyl)oxy]carbonyl
HATU	-O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluronium hexaflophosphat
HBTU	-O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat
Et ₂ O	- dietyl ete
EtOAc	- etyl axetat
i-Pr ₂ O	- di-isopropyl ete
Config.	- cấu hình tuyệt đối
Thuốc thử Lawesson	-2,4-bis(4-metoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan-2,4-disulphit
MeCN	- axetonitril
MeOH	- metanol
Rt	- thời gian lưu
THF	- tetrahydrofuran
RT	- nhiệt độ phòng
Pd/C	- paladi trên cacbon

LC/MS chỉ phân tích bằng HPLC được tiến hành trên hai loại thiết bị:

a) trên cột Supelcosil LCABZ+PLUS (3 μ m, 3,3cm x 4,6mm ID) tách rửa bằng HCO₂H 0,1% và amoni axetat 0,01M trong nước (dung môi A), và 95% axetonitril và 0,05% HCO₂H trong nước (dung môi B), sử dụng gradient tách rửa sau 0-0,7 phút 0%B, 0,7-4,2 phút 0→100%B, 4,2-5,3 phút 100%B, 5,3-5,5 phút 100→0%B với tốc độ dòng là 3ml/phút. Phổ khối (MS) được ghi lại trên máy đo khối phổ Fisons VG Platform sử dụng quá trình ion hóa dương phun điện tích [(ES+ve để tạo ra ion phân tử [M+H]⁺ và [M+NH₄]⁺] hoặc ion âm hóa phun điện tích [(ES-ve để tạo ra ion phân tử [M-H]⁻]. Số liệu phân tích từ thiết này được đưa ra theo định dạng sau: [M+H]⁺ hoặc [M-H]⁻.

b) trên cột Chromolith Performance RP 18 (100 x 4,6mm id) tách rửa bằng 0,01M amoni axetat trong nước (dung môi A) và 100% axetonitril (dung môi B), sử dụng gradient tách rửa sau 0-4 phút 0 →100% B, 4-5 phút 100% B với tốc độ dòng 5ml/phút. Phổ khối (MS) được ghi lại trên máy đo khối phổ micromass Platform-LC sử dụng quá trình ion hóa dương hóa học áp lực khí quyển [AP+ve để tạo ra ion phân tử MH⁺] hoặc quá trình ion hóa âm hóa học áp lực khí quyển [AP-ve để tạo ra ion phân tử (M-H)⁻]. Số liệu phân tích từ thiết này được đưa ra theo định dạng sau: [M+H]⁺ hoặc [M-H]⁻ đứng trước là chữ viết tắt APCI để phân biệt giữa hai nguồn phân tích khối phổ.

LC/HRMS: HPLC phân tích được tiến hành trên cột Uptisphere-hsc (3 μ m 33 x 3mm id) tách rửa bằng 0,01M amoni axetat trong nước (dung môi A) và 100% axetonitril (dung môi B), sử dụng gradient tách rửa sau 0-0,5 phút 5% B, 0,5-3,75 phút 5→100% B, 3,75-4,5 100% B, 4,5-5 100→5% B, 5-5,5 5% B ở tốc độ dòng 1,3ml/phút. Phổ khối (MS) được ghi lại trên máy khối phổ micromass LCT sử dụng quá trình ion hóa dương phun điện tích [ES+ve để tạo ra ion phân tử MH⁺] hoặc quá trình ion hóa âm phun điện tích [ES-ve để tạo ra ion phân tử (M-H)⁻].

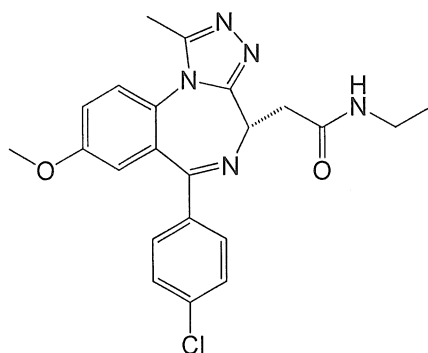
Phương pháp bào chế tự động khối lượng lớn HPLC dùng để chỉ phương pháp trong đó vật liệu được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao trên cột HPLCABZ+ 5 μ m (5cm x 10mm i.d.) với HCO₂H 0,1% trong nước và 95% MeCN, 5% nước (0,5% HCO₂H) sử dụng gradient tách rửa: 0-1,0 phút 5%B, 1,0-8,0 phút 5→30%B, 8,0-8,9

phút 30%B, 8,9-9,0 phút 30→95%B, 9,0-9,9 phút 95%B, 9,9-10 phút 95→0%B ở tốc độ dòng 8ml/phút. Máy thu phân đoạn Gilson 202-fraction được kích hoạt bởi máy khối phổ VG Platform Mass Spectrometer để phát hiện khối lượng cần quan tâm.

Phổ Proton NMR (^1H NMR) được ghi ở nhiệt độ môi trường trên máy khối phổ Bruker Avance 300 DPX sử dụng dung môi là chuẩn nội và sự chuyển đổi hóa học proton được thể hiện theo ppm trong dung môi được chỉ ra. Các chữ viết tắt sau đây được sử dụng để nhận tín hiệu NMR: s = đơn, d = gấp đôi, t = gấp ba, q = gấp bốn, dd = gấp đôi hai lần, m = gập nhiều lần.

TLC (sắc ký lớp mỏng) là sử dụng đĩa TLC được bán bởi Merck được phủ silica gel 60 F254.

Ví dụ 1: 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamid

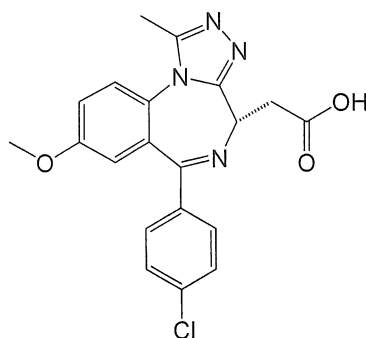


Dung dịch axit [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetic (bào chế xem phần chất trung gian 1) (16,0g, 40mmol) trong THF ở RT được bổ sung DIEA (14ml, 80mmol) sau đó là HATU (30,4g, 80mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ này và etylamin (40ml, 2M trong THF, 80mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy trong 48 giờ trước khi được cô đặc ở áp suất giảm. Sản phẩm thô được phân tán trong nước và chiết bằng DCM. Lốp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Chất rắn thô được tinh chế bằng sắc ký trên SiO_2 (DCM/MeOH 95/5) và chất rắn hình thành được tái kết tinh trong MeCN. Chất rắn sau đó được hòa tan trong DCM và kết tủa bằng i- Pr_2O để tạo ra hợp chất tiêu đề (8g, 47% hiệu suất) ở dạng chất rắn màu trắng.

R_f = 0,48 (DCM/MeOH: 90/10). Mp >140°C (trở thành dạng gôm). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,53-7,47 (m, 2H), 7,39 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,37-7,31 (m, 2H), 7,20

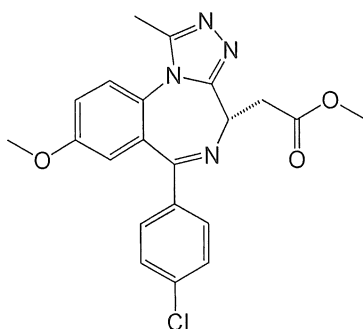
(dd, $J = 2,9$ và $8,9$ Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 6,40 (m, 1H), 4,62 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,51 (dd, $J = 7,3$ và $14,1$ Hz, 1H), 3,46-3,21 (m, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,19 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). LC/MS: m/z 424 $[M(^{35}\text{Cl})+H]^+$, Rt 2,33 phút.

Chất trung gian 1: [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axit axetic



Dung dịch methyl [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetat (bào chế xem phần chất trung gian 2) (28g, 68mmol) trong THF (450ml) ở RT được bổ sung NaOH 1N (136ml, 136mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ này trong 5 giờ trước khi được làm lạnh và dập tắt bằng HCl 1N (136ml). THF được loại bỏ ở áp suất giảm và lớp nước được chiết bằng DCM. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Chất rắn thô được tái kết tinh trong CH_3CN để tạo ra hợp chất tiêu đề (23,9g, 89% hiệu suất) ở dạng bột màu vàng nhạt. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,55-7,48 (m, 2H), 7,41 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,38-7,31 (m, 2H), 7,22 (dd, $J = 2,9$ và $8,9$ Hz, 1H), 6,90 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,59 (dd, $J = 6,9$ và $6,9$ Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,70 (dd, $J = 6,9$ và $25,7$ Hz, 1H), 3,61 (dd, $J = 6,9$ và $25,7$ Hz, 1H), 2,63 (s, 3H). LC/MS: m/z 397 $[M(^{35}\text{Cl})+H]^+$, Rt 2,11 phút.

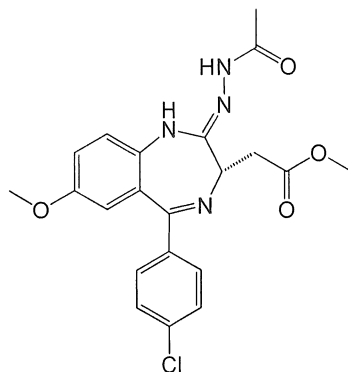
Chất trung gian 2: Metyl [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetat



Metyl [(3S)-2-[(1Z)-2-axetylhydrazino]-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-3H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat thô (bào chế xem phần chất trung gian 3) (34g, 79mmol) được phân tán trong THF (200ml) và AcOH (200ml) được bổ sung ở RT. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ này qua đêm trước khi được cô đặc đến khô. Phần dư được phân tán trong NaHCO₃ bão hòa và chiết bằng DCM. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Chất rắn thô được tinh chế bằng sắc ký trên SiO₂ (DCM/MeOH: 90/10) để tạo ra hợp chất tiêu đề (28g, 86% hiệu suất) ở dạng bột màu vàng.

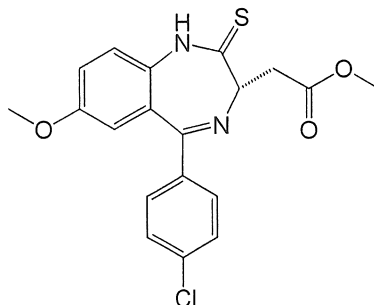
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,54-7,47 (m, 2H), 7,40 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,37-7,31 (m, 2H), 7,22 (dd, J = 2,8 và 8,8 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 4,61 (dd, J = 6,4 và 7,8 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,66 (dd, J = 7,8 và 16,9 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 6,4 và 16,9 Hz, 1H), 2,62 (s, 3H). LC/MS m/z 411 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 2,88 phút.

Chất trung gian 3: Metyl [(3S)-2-[2-axetylhydrazino]-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-3H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat



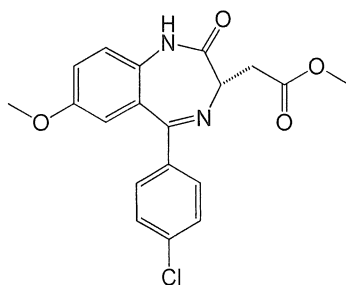
Hỗn dịch metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat (bào chế xem phần chất trung gian 4) (30,2g, 77,7mmol) trong THF (800ml) ở 0°C được bổ sung hydrazin monohydrat (11,3ml, 233mmol) từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ từ 0°C đến 15°C trước khi được làm lạnh đến 0°C. Et₃N (32,4ml, 230mmol) sau đó được thêm từ từ vào và AcCl (16,3ml, 230mmol) được bổ sung từng giọt. Hỗn hợp được để cho đạt đến RT và khuấy trong 1 giờ sau đó được dập tắt bằng nước và cô đặc ở áp suất giảm. Lớp nước được chiết bằng DCM và lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất theo tiêu đề (34g, 100% hiệu suất) được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. LC/MS: m/z 429 [M(³⁵Cl)+H]⁺, Rt 2,83 phút.

Chất trung gian 4: Metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat



Hỗn dịch P_4S_{10} (85,8g, 190mmol) và Na_2CO_3 (20,5g, 190mmol) trong 1,2-DCE (1,5 L) ở RT được khuấy trong một giờ trước khi metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat (bào chế xem phần chất trung gian 5) (40g, 107mmol) được bổ sung. Hỗn hợp hình thành được khuấy ở $65^\circ C$ trong 4 giờ trước khi được làm lạnh và lọc. Chất rắn được rửa bằng DCM và dịch lọc được rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất tiêu đề được kết tủa từ hỗn hợp DCM/ i - Pr_2O và lọc. Dịch lọc được cô đặc và tinh chế bằng sắc ký nhanh (DCM/MeOH: 98/2) để tạo ra một mẻ sản phẩm khác. Hợp chất tiêu đề thu được bằng cách kết hợp hai phân đoạn (30,2g, 73%) ở dạng bột màu vàng. LC/MS: m/z 389 $[M(^{35}Cl)+H]^+$, Rt 3,29 phút.

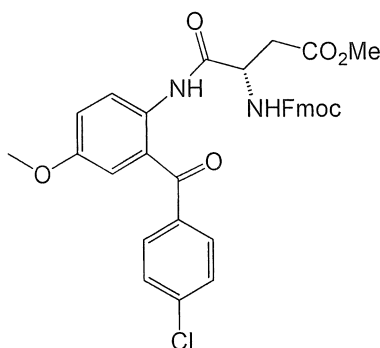
Chất trung gian 5: Metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat



Dung dịch metyl N^1 -[2-[(4-clophenyl)cacbonyl]-4-(metyloxy)phenyl]- N^2 -{[(9H-fluoren-9-ylmetyl)oxy]cacbonyl}-L- α -asparaginat thô (bào chế xem phần chất trung gian 6) (sử dụng 0,2mol) trong DCM (500ml) được bổ sung Et_3N (500ml, 3,65mol) và hỗn hợp hình thành được hồi lưu trong 24 giờ trước khi được cô đặc. Amin thô hình thành được hòa tan trong 1,2-DCE (1,5 L) và AcOH (104ml, 1,8mol) được bổ sung cẩn thận. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở $60^\circ C$ trong 2 giờ trước khi

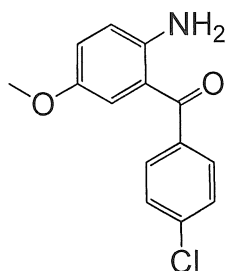
được cô đặc trong chân không và được hòa tan trong DCM. Lớp hữu cơ được rửa bằng HCl 1N và lớp nước được chiết bằng DCM (x3). Lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng nước, và nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Chất rắn thô được tái kết tinh trong MeCN tạo ra hợp chất tiêu đề (51g) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt. Dịch lọc có thể được cô đặc và được tái kết tinh trong MeCN để tạo ra 10g Chất trung gian 9 (tổng số: 61g, 69% hiệu suất dựa trên chất trung gian 12). $R_f = 0,34$ (DCM/MeOH: 95/5). LC/MS m/z 373 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})+\text{H}]^+$, Rt 2,76 phút.

Chất trung gian 6: Metyl N¹-[2-[(4-clophenyl)cacbonyl]-4-(metyloxy)phenyl]-N²-{[(9H-fluoren-9-ylmetyl)oxy]cacbonyl}-L- α -asparaginat



Hỗn hợp metyl N-{[(9H-fluoren-9-ylmetyl)oxy]cacbonyl}-L- α -aspartyl clorua (được bào chế trong J. Org. Chem. 1990, 55, 3068-3074 và J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 2001, 1673-1695) (221g, 0,57mol) và [2-amino-5-(metyloxy)phenyl](4-clophenyl)metanon (bào chế xem phần chất trung gian 7) (133g, 0,5mol) trong CHCl_3 (410ml) được khuấy ở 60°C trong 1,5 giờ trước khi được làm lạnh và cô đặc ở áp suất giảm và sử dụng mà không cần tinh chế thêm. LC/MS: m/z 613 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})+\text{H}]^+$, Rt = 3,89 phút.

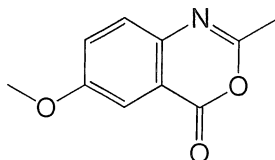
Chất trung gian 7: [2-amino-5-(metyloxy)phenyl](4-clophenyl)metanon



Dung dịch 2-metyl-6-(metyloxy)-4H-3,1-benzoxazin-4-on (bào chế xem phần chất trung gian 8) (40,0g, 0,21mol) trong hỗn hợp toluen (560ml)/ete (200ml) ở 0°C được bổ sung từng giọt dung dịch 4-clophenylmagie bromua (170ml, 1M trong Et_2O ,

0,17mol). Hỗn hợp phản ứng được để cho đạt đến RT và khuấy trong 1 giờ trước khi được dập tắt bằng HCl 1N. Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x) và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất thô được hòa tan trong EtOH (400ml) và HCl 6N (160ml) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được hồi lưu 2 giờ trước khi được cô đặc ở áp suất giảm. Chất rắn hình thành được lọc và rửa hai lần bằng ete trước khi được phân tán trong EtOAc và trung hòa bằng NaOH 1N. Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x) và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất tiêu đề thu được ở dạng chất rắn màu vàng (39g, 88 % hiệu suất) được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Chất trung gian 8: 2-metyl-6-(metyloxy)-4H-3,1-benzoxazin-4-on



Dung dịch 5-metoxyanthranilic axit (7,8g, 46,5mmol) được hồi lưu trong axetic anhydrit (60ml) trong 2 giờ 15 phút trước khi được làm lạnh và cô đặc ở áp suất giảm. Phần dư thô được cô đặc hai lần khi có mặt toluen trước khi được lọc và được rửa bằng ete để tạo ra hợp chất tiêu đề (6,8g, 77% hiệu suất) ở dạng chất rắn màu be; LC/MS: m/z 192 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Rt 1,69 phút.

Bào chế hợp chất tham chiếu để sử dụng trong các thử nghiệm sinh học

Thông tin thử nghiệm về phương pháp LC-MS A và B được đề cập theo sáng chế là như sau:

LC/MS (phương pháp A) được tiến hành trên cột Supelcosil LCABZ+PLUS (3 μm , 3,3cm x 4,6mm ID) tách rửa bằng HCO_2H 0,1% và amoni axetat 0,01M trong nước (dung môi A), và 95% axetonitril và 0,05% HCO_2H trong nước (dung môi B), sử dụng gradient tách rửa sau 0-0,7 phút 0%B, 0,7-4,2 phút 0 $\rightarrow$ 100%B, 4,2-5,3 phút 100%B, 5,3-5,5 phút 100 $\rightarrow$ 0%B với tốc độ dòng là 3ml/phút. Phổ khối (MS) được ghi lại trên máy đo khối phổ Fisons VG Platform sử dụng quá trình ion hóa dương phun điện tích $[(\text{ES}+\text{ve})$ để tạo ra ion phân tử $[\text{M}+\text{H}]^+$ và $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ hoặc ion âm hóa phun điện tích

[(ES-ve để tạo ra ion phân tử $[M-H]^-$]. Số liệu phân tích từ thiết này được đưa ra theo định dạng sau: $[M+H]^+$ hoặc $[M-H]^-$.

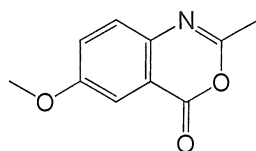
LC/MS (phương pháp B) được tiến hành trên cột Sunfire C18 (30mm x 4,6mm i.d. 3,5 μ m đường kính đóng gói) ở 30°C, tách rửa bằng dung dịch axit strifloaxetic trong nước 0,1% theo thể tích (dung môi A) và dung dịch axit trifloaxetic trong axetonitril 0,1% theo thể tích (dung môi B) sử dụng gradient tách rửa sau 0-0,1min 3%B, 0,1-4,2min 3 – 100% B, 4,2-4,8min 100% B, 4,8-4,9min 100-3%B, 4,9 – 5,0min 3% B ở tốc độ dòng 3ml/phút. Quá trình phát UV là tín hiệu trung bình từ bước sóng 210nm đến 350nm và phổ khối được ghi lại trên máy phổ khối sử dụng quá trình ion hóa phun điện tích dương. Số liệu ion hóa được làm tròn đến số nguyên gần nhất.

LC/HRMS: HPLC phân tích được tiến hành trên cột Uptisphere-hsc (3 μ m 33 x 3mm id) tách rửa bằng 0,01M amoni axetat trong nước (dung môi A) và 100% axetonitril (dung môi B), sử dụng gradient tách rửa sau 0-0,5 phút 5% B, 0,5-3,75 phút 5→100% B, 3,75-4,5 100% B, 4,5-5 100→5% B, 5-5,5 5% B ở tốc độ dòng 1,3ml/phút. Phổ khối (MS) được ghi lại trên máy khối phổ micromass LCT sử dụng quá trình ion hóa dương phun điện tích $[ES+ve]$ để tạo ra ion phân tử MH^+ hoặc quá trình ion hóa âm phun điện tích $[ES-ve]$ để tạo ra ion phân tử $(M-H)^-$.

TLC (sắc ký lớp mỏng) sử dụng đĩa TLC của Merck được phủ silica gel 60 F254.

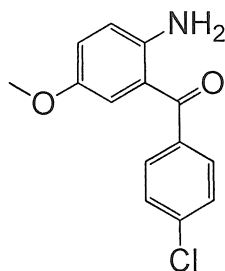
Kỹ thuật sắc ký silica bao gồm kỹ thuật tự động (Flashmaster hoặc Biotage SP4) hoặc sắc ký bằng tay trên (SPE) hoặc cột sắc ký nhanh được nhồi bằng tay.

Hợp chất tham chiếu A: 2-metyl-6-(metyloxy)-4H-3,1-benzoxazin-4-on



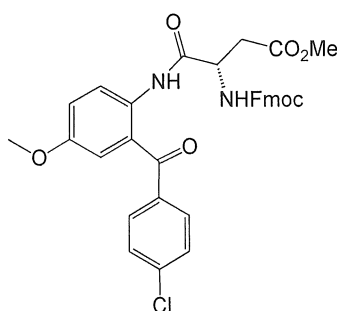
Dung dịch 5-metoxyanthranilic axit (Lancaster) (41,8g, 0,25mol) được hồi lưu trong axetic anhydrit (230ml) trong 3,5 giờ trước khi được cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất thô được cô đặc hai lần khi có mặt toluen trước khi được lọc và rửa hai lần bằng ete để tạo ra hợp chất tiêu đề (33,7g, 71% hiệu suất) ở dạng chất rắn màu nâu; LC/MS (phương pháp A): m/z 192 $[M+H]^+$, Rt 1,69 phút.

Hợp chất tham chiếu B: [2-amino-5-(metyloxy)phenyl](4-clophenyl)metanon



Dung dịch 2-metyl-6-(metyloxy)-4H-3,1-benzoxazin-4-on (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu A) (40,0g, 0,21mol) trong hỗn hợp toluen/ete (2/1) (760ml) ở 0°C được bổ sung từng giọt dung dịch 4-clophenylmagie bromua (170ml, 1M trong Et₂O, 0,17mol). Hỗn hợp phản ứng được để cho đạt đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 1 giờ trước khi được dập tắt bằng HCl 1N (200ml). Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 150ml) và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (100ml), làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất thô được hòa tan trong EtOH (400ml) và HCl 6N (160ml) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được hồi lưu 2 giờ trước khi được cô đặc đến một phần ba thể tích. Chất rắn hình thành được lọc và rửa hai lần bằng ete trước khi được phân tán trong EtOAc và trung hòa bằng NaOH 1N. Lớp nước được chiết bằng EtOAc (3 x 150ml) và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (150ml), làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Hợp chất tiêu đề thu được ở dạng chất rắn màu vàng (39g, 88 % hiệu suất); LC/MS (phương pháp A): m/z 262 [M+H]⁺, Rt 2,57 phút.

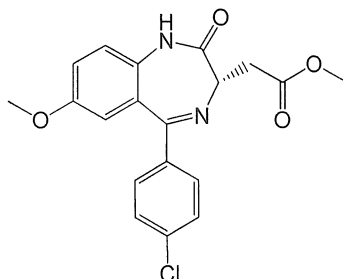
Hợp chất tham chiếu C: Metyl N¹-[2-[(4-clophenyl)cacbonyl]-4-(metyloxy)phenyl]-N²-{[(9H-fluoren-9-ylmetyl)oxy]cacbonyl}-L-α-asparaginat



Metyl N-1-([(9H-fluoren-9-ylmetyl)oxy]cacbonyl)-L-α-aspartyl clorua (Int. J. Peptide Protein Res. 1992, 40, 13-18) (93g, 0,24mol) được hòa tan trong CHCl₃ (270ml) và [2-amino-5-(metyloxy)phenyl](4-clophenyl)metanon (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu B) (53g, 0,2mol) được bổ sung. Hỗn hợp hình thành được khuấy ở 60°C trong 1 giờ trước khi được làm lạnh và cô đặc đến 60% theo thể tích. Ete được bổ sung ở 0°C

và chất kết tủa hình thành được lọc và bỏ đi. Dịch lọc được cô đặc ở áp suất giảm và sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

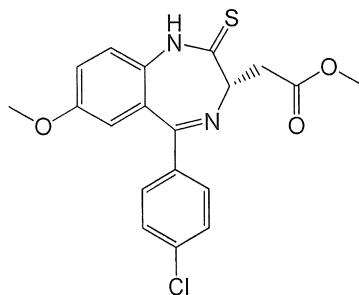
Hợp chất tham chiếu D: Metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat



Dung dịch Metyl N1-[2-[(4-clophenyl)cacbonyl]-4-(metyloxy)phenyl]-N2-[[[(9H-fluoren-9-ylmetyl)oxy]cacbonyl]}-L- α -asparaginat (để bào chế xem hợp chất tham chiếu C) (sử dụng 0,2mol) trong DCM (500ml) được bổ sung Et₃N (500ml, 3,65mol) và hỗn hợp hình thành được hồi lưu 24 giờ trước khi được cô đặc. Amin thô hình thành được hòa tan trong 1,2-DCE (1,5 L) và AcOH (104ml, 1,8mol) được bổ sung cẩn thận. Hỗn hợp phản ứng được khuấy 60°C trong 2 giờ trước khi được cô đặc trong chân không và được hòa tan trong DCM. Lớp hữu cơ được rửa bằng HCl 1N và lớp nước được chiết bằng DCM (x3). Lớp hữu cơ được rửa hai lần bằng nước, và nước muối, làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Chất rắn thô được tái kết tinh trong MeCN tạo ra hợp chất tiêu đề (51g) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt. Dịch lọc có thể được cô đặc và được tái kết tinh trong MeCN để tạo ra thêm 10g sản phẩm mong muốn R_f = 0,34 (DCM/MeOH: 95/5).

HRMS (M+H)⁺ được tính đối với C₁₉H₁₈³⁵ClN₂O₄ 373,0955; xem 373,0957.

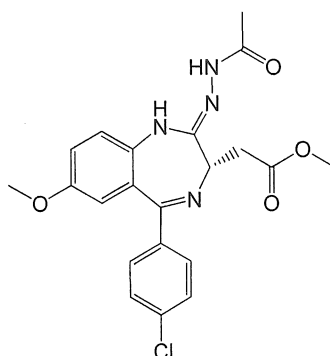
Hợp chất tham chiếu E: Metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat



Hỗn dịch P_4S_{10} (36,1g, 81,1mmol) và Na_2CO_3 (8,6g, 81,1mmol) trong 1,2-DCE (700ml) ở nhiệt độ phòng được khuấy trong 2 giờ trước khi methyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat (để bào chế xem hợp chất tham chiếu D) (16,8g, 45,1mmol) được bổ sung. Hỗn hợp hình thành được khuấy ở 70°C trong 2 giờ trước khi được làm lạnh và lọc. Chất rắn được rửa hai lần bằng DCM và dịch lọc được rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa và nước muối. Lốp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc ở áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silica gel (DCM/MeOH: 99/1) để tạo ra hợp chất tiêu đề (17,2g, 98% hiệu suất) ở dạng chất rắn màu vàng. LC/MS (phương pháp A): m/z 389 $[M(^{35}Cl)+H]^+$, Rt 2,64 phút

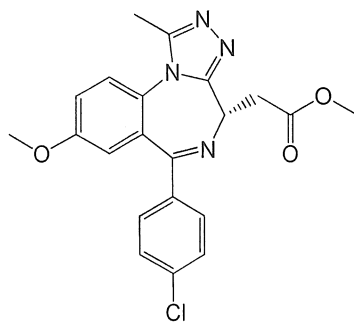
HRMS $(M+H)^+$ được tính đối với $C_{19}H_{18}^{35}ClN_2O_3S$ 389,0727; xem 389,0714.

Hợp chất tham chiếu F: Metyl [(3S)-2-[2-axetylhydrazino]-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-3H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat



Hỗn dịch Metyl [(3S)-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat (để bào chế xem hợp chất tham chiếu E (9,0g, 23,2mmol) trong THF (300ml) ở 0°C được bổ sung hydrazin monohydrat (3,4ml, 69,6mmol) từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ từ 5°C đến 15°C trước khi được làm lạnh đến 0°C. Et_3N (9,7ml, 69,6mmol) sau đó được thêm từ từ vào và axetyl clorua (7,95ml, 69,6mmol) được bổ sung từng giọt. Hỗn hợp được để đạt đến nhiệt độ phòng trong 16 giờ trước khi được cô đặc ở áp suất giảm. Sản phẩm thô được hòa tan trong DCM và được rửa bằng nước. Lốp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất theo tiêu đề (9,7g, 98% hiệu suất) được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. $R_f = 0,49$ (DCM/MeOH: 90/10).

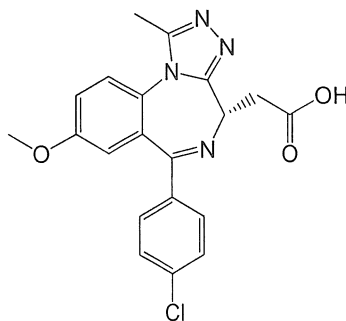
Hợp chất tham chiếu G: Metyl [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetat



Metyl [(3S)-2-[(1Z)-2-axetylhydrazino]-5-(4-clophenyl)-7-(metyloxy)-3H-1,4-benzodiazepin-3-yl]axetat (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu F) thô (sử dụng 19,7g) được phân tán trong THF (100ml) và AcOH (60ml) được bổ sung ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ này trong 2 ngày trước khi được cô đặc ở áp suất giảm. Chất rắn thô được nghiền trong i-Pr₂O và lọc để tạo ra hợp chất tiêu đề (8,7g, 91% trong 3 bước) ở dạng chất rắn màu trắng nhạt.

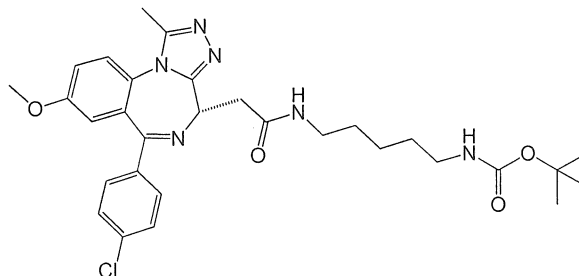
HRMS (M+H)⁺ được tính đối với C₂₁H₂₀ClN₄O₃ 411,1229; xem 411,1245.

Hợp chất tham chiếu H: [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axit axetic



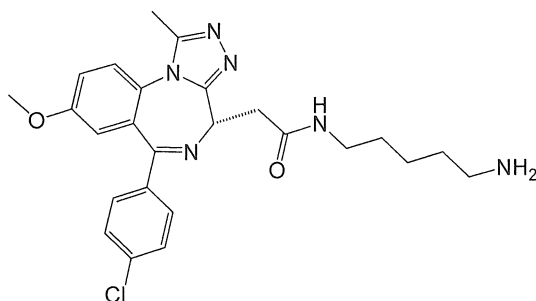
Dung dịch Metyl [(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetat (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu G) (7,4g, 18,1mmol) trong THF (130ml) ở nhiệt độ phòng được bổ sung NaOH 1N (36,2ml, 36,2mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ này trong 5 giờ trước khi được dập tắt bằng HCl 1N (36,2ml) và cô đặc trong chân không. Nước được bổ sung và lớp nước được chiết bằng DCM (x3) và lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc ở áp suất giảm để tạo ra hợp chất tiêu đề (7g, 98% hiệu suất) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

Hợp chất tham chiếu I: 1,1-dimethylethyl [5-({[(4S)-6-(4-chlorophenyl)-1-methyl-8-(methoxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]acetate}amino)pentyl]carbamate



Hỗn hợp [(4S)-6-(4-chlorophenyl)-1-methyl-8-(methoxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]acetate (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu H) (1,0g, 2,5mmol), HATU (1,9g, 5mmol) và DIPEA (0,88ml, 5mmol) được khuấy for 80 phút ở nhiệt độ phòng, hỗn hợp này được bổ sung 1,1-dimethylethyl (4-aminobutyl)carbamate (1,05ml, 5,0mmol, có sẵn từ Aldrich). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ trước khi được cô đặc. Phần dư được hấp thu vào diclometan và được rửa bằng HCl 1N. Lớp nước được chiết bằng diclometan hai lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng 1N natri hydroxit, sau đó là dung dịch natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulphat và cô đặc. Phần dư được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên silica sử dụng diclometan/ metanol 95/5 để tạo ra hợp chất tiêu đề ở dạng chất rắn màu vàng (1,2g). LC/MS (phương pháp A): rt = 3,04 phút.

Hợp chất tham chiếu J: N-(5-aminopentyl)-2-({[(4S)-6-(4-chlorophenyl)-1-methyl-8-(methoxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]acetate}amino)pentyl]trifluoroacetate



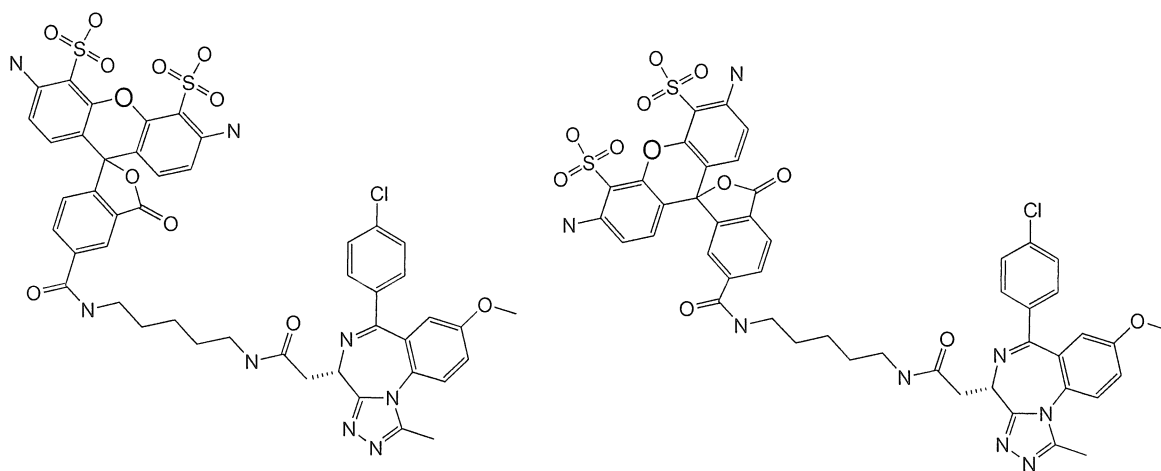
Dung dịch 1,1-dimethylethyl [5-({[(4S)-6-(4-chlorophenyl)-1-methyl-8-(methoxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]acetate}amino)pentyl]carbamate (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu H) (0,2g, 0,34mmol) trong diclometan (3ml) được bổ sung axit trifluoroacetic (0,053ml, 0,68mmol) từng giọt ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng

được khuấy trong 3 giờ từ 0°C đến nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc đến khô để tạo ra hợp chất tiêu đề ở dạng dầu màu vàng có tính hút ẩm (200mg)

LC/MS (phương pháp A): $r_t = 2,33$ phút.

HRMS (M+H)⁺ được tính đối với C₂₅H₂₉ClN₆O₂ 481,2119; xem 481,2162.

Hợp chất tham chiếu K: Hỗn hợp đồng phân 5- và 6- của Alexa Fluor 488-N-(5-aminopentyl)-2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetamit



N-(5-aminopentyl)-2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]axetamit trifloaxetat (để bảo chế xem hợp chất tham chiếu J) (7,65mg, 0,013mmol) được hòa tan trong N,N-Dimetylformamit (DMF) (300 μ l) và được thêm vào este Alexa Fluor 488 carboxylic axit succinimidyl (5mg, 7,77 μ mol, hỗn hợp đồng phân 5 và 6, của Invitrogen, số sản phẩm A-20100) trong ống ly tâm Eppendorf. Bazơ Hunig (7,0 μ l, 0,040mmol) được bổ sung và hỗn hợp được trộn lắc qua đêm. Sau 18 giờ, hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi đến khô và phần dư được tái hòa tan trong DMSO/nước (50%, <1ml tổng số), được tải lên cột Phenomenx Jupiter C18 và tách rửa bằng gradient 95% A: 5% B đến 100% B (A = axit trifloaxetic 0,1% trong nước, B = TFA 0,1%/axetonitril 90%/nước 10%) ở tốc độ dòng 10ml/phút trong 150 phút. Các phân đoạn chưa tinh khiết được kết hợp và tái tinh chế sử dụng phương pháp tương tự. Các phân đoạn được kết hợp và làm bay hơi để tạo ra hỗn hợp theo tiêu đề (2,8mg) là hỗn hợp 2 chất đồng phân vùng. LC/MS (phương pháp B):, MH⁺ = 999, $r_t = 1,88$ phút.

Phương pháp thử nghiệm sinh học

Thử nghiệm liên kết dị hướng huỳnh quang

Đặc tính liên kết của hợp chất có công thức (I) với Bromodomain 2, 3 và 4 được đánh giá sử dụng thử nghiệm liên kết dị hướng huỳnh quang.

Protein Bromodomain, phối tử huỳnh quang (hợp chất tham chiếu K) và hợp chất thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau được ủ vùng nhau để tạo cân bằng nhiệt động học ở điều kiện không có hợp chất thử nghiệm, phối tử huỳnh quang được liên kết đáng kể (>50%) và khi nồng độ của chất ức chế mạnh là đủ, tính dị hướng của phối tử huỳnh quang chưa liên kết là khác biệt đáng kể so với giá trị liên kết.

Tất cả số liệu được chuẩn hóa đến trung bình của 16 giếng đối chứng nồng độ cao và 16 giếng đối chứng nồng độ thấp trên mỗi đĩa. Đường cong 4 tham số sau đây được sử dụng:

$$y = a + ((b - a) / (1 + (10^x / 10^c)^d))$$

Trong đó 'a' là giá trị tối thiểu, 'b' là độ dốc Hill, 'c' là pIC50 và 'd' là giá trị tối đa.

Bromodomain tái tổ hợp của người (Bromodomain 2 (1-473), Bromodomain 3 (1-435) và Bromodomain 4 (1-477)) được biểu hiện trong tế bào E.coli (trong vector pET15b) với đuôi His ở đầu N. Bromodomain được gắn His được chiết từ tế bào E.coli sử dụng lysozym 0,1mg/ml và siêu âm. Sau đó, Bromodomain được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột HisTRAP HP, tách rửa bằng gradient tuyến tính Imidazole 10 đến 500mM, trên 20 Cv. Quá trình tinh chế tiếp theo được thực hiện bằng phương pháp sắc ký cột loại trừ kích thước cấp độ bào chế trên cột Superdex 200. Protein tinh khiết được bảo quản ở -80°C trong HEPES 20mM pH 7,5 và NaCl 100mM.

Quy trình đối với Bromodomain 2: Tất cả các thành phần được hòa tan trong thành phần đệm bao gồm HEPES 50mM pH7,4, NaCl 150mM và CHAPS 0,5mM với nồng độ cuối cùng của Bromodomain 2, 75nM, phối tử huỳnh quang 5nM, 10µl hỗn hợp phản ứng được bổ sung sử dụng thiết bị nhỏ giọt micro vào giếng chứa 100nl nồng độ khác nhau của hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc DMSO (nồng độ cuối cùng 1%) trong đĩa vi chuẩn độ Greiner thể tích thấp màu đen 384 giếng và được làm cân bằng trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Giá trị dị hướng huỳnh quang được đọc trong Envision (λ_{ex} = 485nm, λ_{em} = 530nm; Dichroic -505nm).

Quy trình đối với Bromodoamin 3: Tất cả các thành phần được hòa tan trong thành phần đệm bao gồm HEPES 50mM pH7,4, NaCl 150mM và CHAPS 0,5mM với nồng độ cuối cùng của Bromodomain 3 75nM, phối tử huỳnh quang 5nM. 10 μ l hỗn hợp phản ứng được bổ sung sử dụng thiết bị nhỏ giọt micro vào giếng chứa 100nl nồng độ khác nhau của hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc DMSO (nồng độ cuối cùng 1%) trong đĩa vi chuẩn độ Greiner thể tích thấp màu đen 384 giếng và được làm cân bằng trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Giá trị hị hướng huỳnh quang được đọc trong Envision (λ_{ex} = 485nm, λ_{EM} = 530nm; Dichroic -505nm).

Quy trình đối với Bromodomain 4: Tất cả các thành phần được hòa tan trong thành phần đệm bao gồm HEPES 50mM pH7,4, NaCl 150mM và CHAPS 0,5mM với nồng độ cuối cùng của Bromodomain 4 75nM, phối tử huỳnh quang 5nM. 10 μ l hỗn hợp phản ứng được bổ sung sử dụng thiết bị nhỏ giọt micro vào giếng chứa 100nl nồng độ khác nhau của hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc DMSO (nồng độ cuối cùng 1%) trong đĩa vi chuẩn độ Greiner thể tích thấp màu đen 384 giếng và được làm cân bằng trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Giá trị hị hướng huỳnh quang được đọc trong Envision (λ_{ex} = 485nm, λ_{EM} = 530nm; Dichroic -505nm).

Hợp chất theo ví dụ 1 có giá trị $pIC_{50} \geq 6,0$ trong mỗi thử nghiệm BRD2, BRD3 và BRD4 nêu trên.

Thử nghiệm nồng độ $TNF\alpha$ trong máu toàn phần được kích thích bởi LPS

Quá trình hoạt hóa các tế bào đơn nhân bởi chất chủ vận thụ thể TLR (toll-like receptor) như lipopolysaccarit (LPS) của vi khuẩn sẽ gây ra quá trình sản xuất chất trung gian gây viêm chủ chốt như $TNF\alpha$. Con đường này đã được coi là quan trọng đối với quá trình bệnh sinh của rất nhiều bệnh tự miễn và rối loạn gây viêm.

Hợp chất thử nghiệm được pha loãng để tạo ra một khoảng nồng độ thích hợp và 1ul của dung dịch pha loãng được thêm vào các giếng của đĩa 96 giếng. Sau khi thêm máu toàn phần (130ul) vào đĩa, đĩa sẽ được ủ ở 37°C (5% CO₂) trong 30 phút trước khi thêm 10ul LPS 2,8ug/ml, được pha loãng trong RPMI 1640 toàn phần (nồng độ cuối cùng =200ng/ml), để tạo ra tổng thể tích là 140ul/giếng. Sau khi ủ tiếp trong 24 giờ ở 37°C, 140ul PBS được thêm vào mỗi giếng. Đĩa được gắn kín, lắc trong 10 phút và sau đó ly tâm (2500 vòng/phút x 10 phút). 100ul dịch nổi được lấy ra và nồng độ $TNF\alpha$ được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch (thường bằng kỹ thuật MesoScale

Discovery) ngay lập tức hoặc sau khi bảo quản ở -20°C . Đường cong đáp ứng liều đối với từng hợp chất được dựng từ số liệu và giá trị IC_{50} được tính.

Hợp chất theo ví dụ 1 có giá trị $\text{pIC}_{50} > 6,0$ trong thử nghiệm trên.

Số liệu trên đã chứng tỏ rằng hợp chất theo ví dụ 1 được thử nghiệm trong thử nghiệm trên đã ức chế quá trình sản xuất chất trung gian gây viêm chủ chốt $\text{TNF}\alpha$. Điều này chỉ ra rằng hợp chất theo sáng chế có đặc tính chống viêm mạnh, và có thể có lợi ích trên lâm sàng trong điều trị rối loạn viêm.

Mẫu chuột bị nhiễm nội độc tố trong máu

Liều cao nội độc tố (lipopolysaccharit của vi khuẩn) được sử dụng cho động vật để tạo ra hội chứng sốc bao gồm đáp ứng viêm mạnh, mất điều hòa chức năng tim mạch, suy phủ tạng và cuối cùng là chết. Kiểu đáp ứng này là rất giống với tình trạng nhiễm trùng huyết và sốc nhiễm khuẩn ở người, trong đó đáp ứng của cơ thể với quá trình lây nhiễm vi khuẩn có thể gây nguy hiểm đến tính mạng.

Để thử nghiệm hợp chất có công thức (I) và muối được dựng của chúng, các nhóm gồm 8 chuột nhắt đực Balb/c được tiêm vào phúc mạc ổ bụng liều gây chết là 15mg/kg LPS. 90 phút sau, chuột được tiêm tĩnh mạch chất dẫn thuốc (20% xyclodextrin 1% etanol trong nước cất) hoặc hợp chất thử nghiệm (10mg/kg). Mức độ sống sót của động vật nghiên cứu được theo dõi vào ngày thứ 4.

Số lượng động vật nghiên cứu sống sót vào ngày 4 (tổng của nhiều thử nghiệm lặp lại)

Chất dẫn thuốc	4/66 (6%)
----------------	-----------

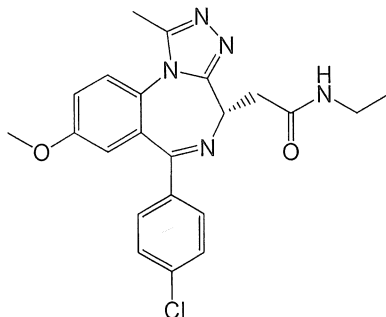
Hợp chất theo ví dụ 1	24/56 (52%)
-----------------------	-------------

Số liệu này chỉ ra rằng hợp chất theo ví dụ 1 được thử nghiệm đã làm tăng khả năng sống sót của động vật nghiên cứu một cách đáng kể sau khi dùng qua đường tiêm tĩnh mạch. Điều này chỉ ra rằng hợp chất có công thức (I) có tác dụng mạnh lên đáp ứng viêm ở người.

Tất cả ấn phẩm, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở patent và đơn patent, được viện dẫn trong bản mô tả đều có mục đích tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

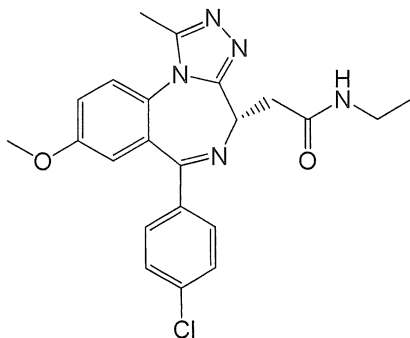
1. Hợp chất có công thức (I) là 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamit



(I)

hoặc muối của nó.

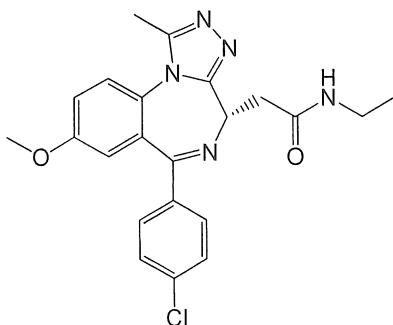
2. Hợp chất có công thức (I) là 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamit



(I)

hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất có công thức (I) là 2-[(4S)-6-(4-clophenyl)-1-metyl-8-(metyloxy)-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepin-4-yl]-N-etylaxetamit



(I)

4. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó theo điểm 2 và một hoặc nhiều chất mang dược dụng, chất pha loãng hoặc tá dược.
5. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) theo điểm 3 và một hoặc nhiều chất mang dược dụng, chất pha loãng hoặc tá dược.