



(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)



1-0023486

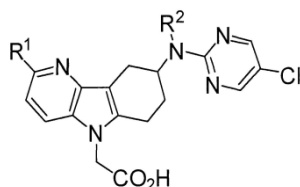
(51)⁷ C07D 471/04; A61K 31/437; A61P
37/00

(13) B

- (21) 1-2016-03842 (22) 16/03/2015
(86) PCT/IB2015/051895 16/03/2015 (87) WO2015/140684 24/09/2015
(30) PCT/IB2014/059883 17/03/2014 IB
(45) 27/04/2020 385 (43) 26/12/2016 345A
(73) IDORSIA PHARMACEUTICALS LTD. (CH)
Hegenheimermattweg 91, CH-4123 Allschwill, Switzerland
(72) AISSAOUI, Hamed (FR); BOSS, Christoph (CH); BOUIS, Patrick (FR);
HAZEMANN, Julien (FR); SIEGRIST, Romain (CH)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT AXIT AZAINĐOL AXETIC VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất axit azainđol axetic có công thức (I):



(I)

trong đó R¹ và R² là như được mô tả trong phần mô tả, và dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất này là hữu hiệu để làm chất điều biến thụ thể prostaglandin, đặc biệt nhất là chất điều biến thụ thể prostaglandin D₂, trong điều trị các bệnh và rối loạn khác nhau qua trung gian prostaglandin. Các hợp chất này cũng hữu hiệu để bào chế thuốc để phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh và rối loạn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất axit azainđol axetic có công thức (I) và được phẩm chứa các hợp chất này. Các hợp chất này được sử dụng làm chất điều biến thụ thể prostaglandin, đặc biệt nhất là chất điều biến thụ thể prostaglandin D₂ (“thụ thể DP”), trong điều trị các bệnh và rối loạn khác nhau qua trung gian prostaglandin. Cụ thể, các hợp chất này có thể được sử dụng một mình hoặc sử dụng trong dược phẩm để điều trị các bệnh/rối loạn dị ứng/tự miễn cả mạn tính và cấp tính như hen, hen do dị ứng, hen ưa eosin, hen nặng, viêm mũi, viêm mũi dị ứng, phù mạch, dị ứng với nọc độc của côn trùng, dị ứng thuốc, viêm xoang dị ứng, viêm thận dị ứng, viêm màng kết dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền, hen phế quản, dị ứng thực phẩm, rối loạn tế bào bón toàn thân, sốc mẫn cảm, mày đay, eczema, viêm loét ruột kết, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh ruột viêm và viêm khớp dạng thấp; bệnh liên quan đến tế bào ưa eosin bao gồm chứng viêm mạch nhỏ giống hội chứng Churg-Strauss, bệnh u hạt Wegener, viêm đa vi mạch (và các tập hợp con đặc hiệu tổ chức vi mạch), hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin như viêm phổi ưa eosin, viêm thực quản ưa eosin, viêm thực quản trào ngược, viêm màng trong tim ưa eosin (viêm màng trong tim Loeffler), hội chứng đau cơ ưa eosin, viêm bao cơ ưa eosin, viêm nang lông dạng mũ ưa eosin (bệnh Ofuji's), loét ưa eosin, tăng sản mạch bạch huyết với bạch cầu ưa eosin (angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia - ALHE), viêm mô tế bào ưa eosin (hội chứng Wells), bệnh bạch cầu ưa eosin mạn tính và hội chứng DRESS (hội chứng phát ban do thuốc với tăng bạch cầu ưa eosin và những hội chứng toàn thân); và các bệnh liên quan đến ưa bazơ, bao gồm bệnh bạch cầu ưa bazơ và chứng tăng bạch cầu ưa bazơ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để đáp ứng với sự tiếp xúc dị ứng nguyên trong các tình trạng bệnh dị ứng, các tế bào bón được hoạt hóa và giải phóng các chất trung gian như histamin, thromboxan A₂ (TxA₂), xysteinyl leukotrien (CysLTs) và prostaglandin D₂ (PGD₂).

Các chất trung gian này tương tác với các thụ thể tương ứng của chúng và gây ra các tác động sinh lý như tính thấm qua mạch gia tăng, phù, ngứa, xung huyết mũi và phổi, co thắt phế quản, và tiết dịch nhầy. Chẳng hạn, tính thấm qua mạch gia tăng giúp cho các bạch cầu ưa eosin và ưa bazơ thấm quá mức vào mô và do đó khuếch đại đáp ứng dị ứng này.

Các phương pháp điều trị hiện nay đối với các bệnh dị ứng bao gồm các chất mà có thể phong bế hoặc theo cách khác phá vỡ những tương tác này, *chẳng hạn* kháng-histamin (chất đối kháng thụ thể histamin H1), chất đối kháng thụ thể leukotrien, chất chủ vận thụ thể giải phóng beta-adrenalin, và corticosteroid. Thông thường, việc điều trị bằng kháng-histamin và chất đối kháng leukotrien bị hạn chế do hiệu quả không cao, và việc sử dụng corticosteroid trong thời gian dài thường đi kèm với những tác dụng phụ không mong muốn.

PGD₂ là chất chủ vận được biết là tác động lên hai thụ thể bắt cặp với G protein, thụ thể PGD₂ DP1 và gần đây được xác định là thụ thể CRTH2 (thụ thể hóa hướng động-phân tử tương đồng được biểu hiện trên tế bào Th2) (còn được gọi như là “thụ thể DP2”).

Mức PGD₂ gia tăng được xem là gây ra sự viêm như được quan sát ở các bệnh dị ứng như viêm mũi dị ứng, hen do dị ứng, viêm màng kết dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền và các bệnh tương tự. Vì vậy, việc phong bế tương tác giữa PGD₂ với thụ thể của nó được xem là chiến lược điều trị hữu hiệu để điều trị những bệnh này.

GB 2388540 bộc lộ việc sử dụng ramatroban (axit (3R)-3-(4-flobenzen-sulfonamido)-1,2,3,4-tetrahydrocarbazol-9-propionic), chất đối kháng thụ thể TxA₂ (còn được đề cập đến như là “thụ thể TP”) với hoạt tính đối kháng bổ sung trên CRTH2, để phòng ngừa và điều trị các bệnh dị ứng, như hen, viêm mũi dị ứng hoặc viêm màng kết dị ứng. Trong tài liệu T. Ishizuka et al., *Cardiovascular Drug Rev.* **2004**, 22(2), 71-90 tác động của ramatroban đến sự viêm ở giai đoạn muộn được mô tả. Ngoài ra, độ sinh khả dụng qua đường miệng của ramatroban và khả năng ức chế sự di chuyển tế bào ưa eosin gây ra bởi prostaglandin D₂ *in vitro* của nó đã được báo cáo (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **305**(1), p.347-352 (2003)).

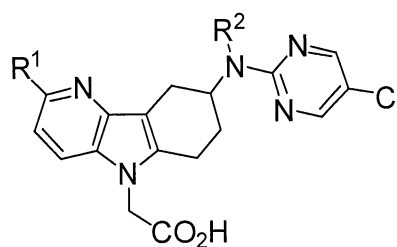
Dẫn xuất axit azainđol axetic với hoạt tính đối kháng CRTH2 đã được bộc lộ trong WO 2010/054113, WO 2010/054114 và B.A. Stearns et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 4647-4651.

WO 2011/117798 và WO 2012/140612 bộc lộ axit (3-heteroaryl-amino-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)-axetic và dẫn xuất axit (7-heteroaryl-amino-6,7,8,9-tetrahydropyrido[1,2-a]indol-10-yl)axetic tương ứng, các dẫn xuất này có hoạt tính đối kháng CRTH2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nay đã phát hiện ra rằng dẫn xuất axit azainđol axetic cụ thể được thể bằng nhóm 5-clo-pyrimidin-2-ylamino có đặc tính cải thiện đáng kể trong thử nghiệm tính độc tế bào *in-vitro* ở tế bào gan chuột nhắt được nuôi cấy sơ cấp. Vì vậy, mong đợi là các hợp chất theo sáng chế có tính độc được cải thiện *in-vivo*.

1) Sáng chế đề cập đến dẫn xuất axit azainđol axetic có công thức (I),



(I)

trong đó,

R¹ là hydro, (C₁₋₄)alkyl, (C₁₋₂)floalkyl, (C₁₋₄)alkoxy, hoặc halogen; và

R² là hydro hoặc metyl;

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

2) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) theo phương án 1), trong đó:

R¹ là hydro, metyl, triflometyl, metoxy, hoặc flo;

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

3) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) theo phương án 1), trong đó:

R^1 là hydro, (C_{1-4}) alkyl, hoặc (C_{1-4}) alkoxy;

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

4) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) theo phương án 1), trong đó:

R^1 là hydro, metyl, hoặc metoxy;

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

5) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 4), trong đó:

R^2 là metyl;

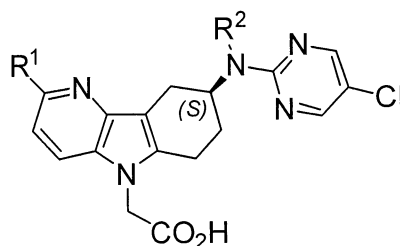
và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

6) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 4), trong đó:

R^2 là hydro;

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

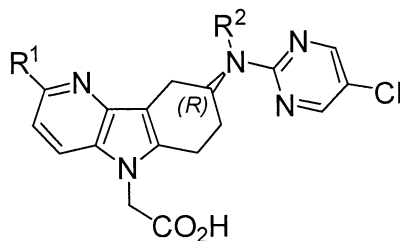
7) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 6), trong đó cấu hình tuyệt đối của tâm lập thể là như được mô tả trong công thức (I_{st1}):



(I_{st1})

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

8) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 6), trong đó cấu hình tuyệt đối của tâm lập thể là như được mô tả trong công thức (I_{st2}):

(I_{st2})

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

9) Một phương án khác của sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1) hoặc từ 5) đến 8), trong đó:

R¹ là flo;

và đề cập đến muối (cụ thể là muối dược dụng) của các hợp chất này.

10) Ví dụ về hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) được chọn từ nhóm gồm:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic; và

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của các hợp chất này;

cần hiểu rằng đối với hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất được liệt kê ở trên, tâm lập thể, mà không được chỉ ra một cách cụ thể, có thể là ở cấu hình (*R*)-tuyệt đối hoặc (*S*) tuyệt đối; ví dụ hợp chất được liệt kê là axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic có thể là axit (*R*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic, axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic hoặc hỗn hợp bất kỳ của nó.

11) Các ví dụ ưu tiên về hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) được chọn từ nhóm gồm:

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic; và

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của các hợp chất này;

12) Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (và đáng chú ý là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

13) Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (và đáng chú ý là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

14) Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (và đáng chú ý là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

15) Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic axit (và đáng chú ý là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

16) Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (và đáng chú ý là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

17) Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (và đáng chú ý là axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-

yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

18) Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1) là:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (và đáng chú ý là axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic);

hoặc muối (cụ thể là muối được dụng) của hợp chất này;

19) Vì vậy, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa trong phương án 1), và đề cập đến các hợp chất như vậy còn bị giới hạn tiếp bởi các đặc trưng của phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2) đến 18), tất cả đều có xem xét đến tính phụ thuộc tương ứng của chúng; đề cập đến muối được dụng của chúng. Bản mô tả mô tả việc sử dụng các hợp chất này để làm thuốc đặc biệt là trong điều trị các bệnh được chọn từ nhóm gồm các bệnh/rối loạn dị ứng/tự miễn mạn tính và cấp tính, bao gồm hen, hen do dị ứng, hen ưa eosin, hen nặng, viêm mũi, viêm mũi dị ứng, phù mạch, dị ứng với nọc độc của côn trùng, dị ứng thuốc, viêm xoang dị ứng, viêm thận dị ứng, viêm màng kết dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền, hen phế quản, dị ứng thực phẩm, rối loạn tế bào bón toàn thân, sốc mẫn cảm, mày đay, eczema, viêm loét ruột kết, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh ruột viêm và viêm khớp dạng thấp; bệnh liên quan đến tế bào ưa eosin bao gồm chứng viêm mạch nhỏ như hội chứng Churg-Strauss, bệnh u hạt Wegener, viêm đa vi mạch (và các tập hợp con đặc hiệu của các tổ chức đa vi mạch), hội chứng tăng bạch cầu

ura eosin như viêm phổi ura eosin, viêm thực quản ura eosin, viêm thực quản trào ngược, viêm màng trong tim ura eosin (viêm màng trong tim Loeffler), hội chứng đau cơ ura eosin, viêm bao cơ ura eosin, viêm nang lông dạng mũ ura eosin (bệnh Ofuji), loét ura eosin, tăng sản mạch bạch huyết với tế bào ura eosin (ALHE), viêm mô tế bào ura eosin (hội chứng Wells), bệnh bạch cầu ura eosin mạn tính và hội chứng DRESS (hội chứng phát ban do thuốc với tăng bạch cầu ura eosin và những hội chứng toàn thân); và các bệnh liên quan đến tế bào ura bazơ, bao gồm bệnh bạch cầu ura bazơ và chứng tăng bạch cầu ura bazơ. Vì vậy, các phương án cụ thể sau đây đề cập đến hợp chất có công thức (I) có thể tồn tại và được mong đợi và được bộc lộ một cách cụ thể trong bản mô tả này ở dạng riêng biệt: 1, 2+1, 3+1, 4+1, 5+1, 5+2+1, 5+3+1, 5+4+1, 6+1, 6+2+1, 6+3+1, 6+4+1, 7+1, 7+2+1, 7+3+1, 7+4+1, 7+5+1, 7+5+2+1, 7+5+3+1, 7+5+4+1, 7+6+1, 7+6+2+1, 7+6+3+1, 7+6+4+1, 8+1, 8+2+1, 8+3+1, 8+4+1, 8+5+1, 8+5+2+1, 8+5+3+1, 8+5+4+1, 8+6+1, 8+6+2+1, 8+6+3+1, 8+6+4+1, 9+1, 9+5+1, 9+6+1, 9+7+1, 9+7+5+1, 9+7+6+1, 9+8+1, 9+8+5+1, 9+8+6+1, 10+1, 11+1, 12+1, 13+1, 14+1, 15+1, 16+1, 17+1, và 18+1; trong danh sách nêu trên, các số dùng để chỉ các phương án theo số thứ tự của chúng to được nêu trong bản mô tả này, trong đó “+” chỉ ra sự phụ thuộc vào một phương án khác. Các phương án riêng biệt khác nhau được cách nhau bởi dấu phẩy. Nói cách khác, ví dụ “5+2+1” dùng để chỉ phương án 5) phụ thuộc vào phương án 2), phụ thuộc vào phương án 1), nghĩa là phương án “5+2+1” tương ứng với hợp chất ở phương án 1) còn bị giới hạn bởi các dấu hiệu của các phương án 2) và 5).

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa hợp chất nêu trên hoặc muối được dụng của nó và chất mang được dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Các định nghĩa được đưa ra ở đây nhằm áp dụng đồng nhất cho các hợp chất có công thức (I) như được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), và, có thay đổi nếu cần thiết, trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ trừ khi định nghĩa chỉ ra riêng theo cách khác đưa ra định nghĩa rộng hơn hoặc hẹp hơn. Cũng cần hiểu rõ rằng định nghĩa hoặc định nghĩa được ưu tiên của một thuật ngữ

xác định và có thể thay thế cho thuật ngữ tương ứng theo cách độc lập với (và phối hợp với) định nghĩa bất kỳ hoặc định nghĩa được ưu tiên của bất kỳ hoặc tất cả các thuật ngữ khác như được xác định trong bản mô tả này.

Các hợp chất có công thức (I) như được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), có thể chứa một hoặc nhiều tâm lập thể hoặc tâm bất đối, như một hoặc nhiều nguyên tử cacbon bất đối. Vì vậy, hợp chất có công thức (I) có thể có mặt ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân lập thể hoặc ở dạng được làm giàu về mặt đồng phân lập thể, tốt hơn là ở dạng chất đồng phân lập thể tinh khiết. Hỗn hợp gồm các chất đồng phân lập thể có thể được tách theo cách mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Thuật ngữ "được làm giàu", chẳng hạn khi được sử dụng trong ngữ cảnh chất đồng phân đối ảnh, được hiểu trong ngữ cảnh của sáng chế đặc biệt có nghĩa là chất đồng phân đối ảnh tương ứng này có mặt với tỷ lệ (độ tinh khiết được điều chỉnh nếu cần) ít nhất là 70:30, và đáng chú ý là ít nhất là 90:10 (độ tinh khiết được điều chỉnh là 70% / 90%) đối với các chất đồng phân đối ảnh khác tương ứng. Tốt hơn là thuật ngữ này dùng để chỉ chất đồng phân đối ảnh tương ứng về cơ bản tinh khiết. Thuật ngữ "về cơ bản", chẳng hạn khi được sử dụng trong thuật ngữ như "về cơ bản tinh khiết" được hiểu trong ngữ cảnh của sáng chế đặc biệt có nghĩa là chất đồng phân lập thể / chế phẩm / hợp chất v.v. tương ứng chứa một lượng ít nhất là 90, đặc biệt ít nhất là 95, và đáng chú ý ít nhất là 99 phần trăm trọng lượng của chất đồng phân lập thể / chế phẩm / hợp chất v.v. tương ứng ở dạng tinh khiết.

Thuật ngữ "alkyl", được sử dụng một mình hoặc kết hợp, dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa một đến bốn nguyên tử cacbon. Thuật ngữ "(C_{x-y})alkyl" (mỗi x và y là một số nguyên), dùng để chỉ nhóm alkyl như được định nghĩa trước đây chứa từ x đến y nguyên tử cacbon. Ví dụ nhóm (C₁₋₄)alkyl chứa từ một đến bốn nguyên tử cacbon. Ví dụ về nhóm alkyl bao gồm metyl, etyl, *n*-propyl, *iso*-propyl, *n*-butyl, *iso*-butyl, *sec*-butyl và *tert*-butyl; tốt hơn là metyl.

Thuật ngữ "alkoxy", được sử dụng một mình hoặc kết hợp, dùng để chỉ nhóm alkyl-O- trong đó nhóm alkyl là như được định nghĩa trên đây. Thuật ngữ "(C_{x-y})alkoxy" (mỗi x và y là một số nguyên) dùng để chỉ nhóm alkoxy như được định

nghĩa trên đây chứa từ x đến y nguyên tử cacbon. Ví dụ, nhóm (C₁₋₄)alkoxy chứa từ một đến bốn nguyên tử cacbon. Ví dụ về nhóm alkoxy bao gồm metoxy, etoxy, *n*-propoxy, *iso*-propoxy, *n*-butoxy, *iso*-butoxy, *sec*-butoxy và *tert*-butoxy; tốt hơn là metoxy.

Thuật ngữ “(C_{x-y})floalkyl” (mỗi x và y là số nguyên) dùng để chỉ nhóm alkyl như được định nghĩa trên đây chứa từ x đến y nguyên tử cacbon trong đó một hoặc nhiều (và có thể tất cả) nguyên tử hydro được thay bằng flo. Ví dụ, nhóm (C₁₋₂)floalkyl chứa một hoặc hai nguyên tử cacbon trong đó một đến năm nguyên tử hydro được thay bằng flo. Các ví dụ điển hình của nhóm này là điflometyl, triflometyl, 2,2-đifloetyl và 2,2,2-trifloetyl; tốt hơn là triflometyl.

Thuật ngữ halogen có nghĩa là flo, clo, brom hoặc iot; tốt hơn là flo.

Khi dạng số nhiều được sử dụng cho các hợp chất, muối, dược phẩm, bệnh hoặc các đối tượng tương tự, dạng này được dự định cũng có nghĩa là một hợp chất, muối, dược phẩm, bệnh hoặc đối tượng tương tự.

Ám chỉ bất kỳ đến hợp chất có công thức (I) như được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19) được hiểu là cũng đề cập đến muối (và đặc biệt là muối dược dụng) của các hợp chất này, nếu phù hợp và có lợi.

Thuật ngữ "muối dược dụng" dùng để chỉ muối mà vẫn có hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất đã nêu và thể hiện tác dụng gây độc không mong muốn ở mức tối thiểu. Những muối như vậy bao gồm muối cộng axit và/hoặc bazơ vô cơ hoặc hữu cơ tùy thuộc vào sự có mặt của các nhóm bazơ và/hoặc axit trong hợp chất đã nêu. Để tham khảo, xem tài liệu ‘Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use.’, P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.), Wiley-VCH, 2008 và ‘Pharmaceutical Salts and Co-crystals’, Johan Wouters và Luc Quéré (Eds.), RSC Publishing, 2012 chẳng hạn.

Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất có công thức (I) được đánh dấu bằng chất đồng vị, đặc biệt là được đánh dấu bằng ²H (đơteri), các hợp chất này là giống hệt với các hợp chất có công thức (I) chỉ khác là mỗi trong số một hoặc nhiều nguyên tử được thay bằng một nguyên tử có cùng nguyên tử số nhưng khối lượng nguyên tử

khác với khối lượng nguyên tử thường được tìm thấy trong tự nhiên. Hợp chất có công thức (I) được đánh dấu bằng chất đồng vị, đặc biệt là được đánh dấu bằng 2H (đơteri) và muối của nó là thuộc phạm vi của sáng chế. Việc thay thế hydro bằng đồng vị 2H (đơteri) nặng hơn có thể dẫn đến độ ổn định chuyển hóa lớn hơn, chẳng hạn dẫn đến chu kỳ bán rã in-vivo gia tăng hoặc yêu cầu liều lượng giảm, hoặc có thể dẫn đến sự ức chế enzym cytochrome P450 là giảm, dẫn đến profile an toàn được cải thiện chẳng hạn. Theo một phương án của sáng chế, hợp chất có công thức (I) không được đánh dấu bằng chất đồng vị, hoặc chúng chỉ được đánh dấu bằng một hoặc nhiều nguyên tử đơteri. Theo một phương án phụ, hợp chất có công thức (I) không hề được đánh dấu bằng chất đồng vị. Hợp chất có công thức (I) được đánh dấu bằng chất đồng vị có thể được điều chế theo phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả dưới đây, nhưng sử dụng biến thể đồng vị thích hợp của các chất phản ứng hoặc các chất ban đầu thích hợp.

Bất cứ khi nào từ “giữa” được sử dụng để mô tả một khoảng bằng số, cần hiểu rằng các điểm đầu và cuối của khoảng đã chỉ ra được bao hàm một cách rõ ràng trong khoảng này. Ví dụ: nếu khoảng nhiệt độ được mô tả là khoảng giữa 40°C và 80°C , điều này có nghĩa là các điểm đầu và cuối là 40°C và 80°C được bao hàm trong khoảng này; hoặc nếu một biến số được định nghĩa là số nguyên giữa 1 và 4, điều đó có nghĩa là biến số này là số nguyên 1, 2, 3, hoặc 4.

Trừ khi được sử dụng đối với nhiệt độ, thuật ngữ “khoảng” (hoặc theo cách khác “gần”) được đặt trước giá trị bằng số “X” trong đơn sáng chế này dùng để chỉ một khoảng kéo dài từ X trừ 10% của X đến X cộng 10% của X, và tốt hơn là dùng để chỉ một khoảng kéo dài từ X trừ 5% của X đến X cộng 5% của X. Trong trường hợp cụ thể của nhiệt độ, thuật ngữ “khoảng” (hoặc theo cách khác “gần”) được đặt trước nhiệt độ “Y” trong bản mô tả này dùng để chỉ khoảng kéo dài từ nhiệt độ Y trừ 10°C đến Y cộng 10°C , và tốt hơn là dùng để chỉ khoảng kéo dài từ Y trừ 5°C đến Y cộng 5°C . Ngoài ra, thuật ngữ “nhiệt độ trong phòng” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ nhiệt độ bằng khoảng 25°C .

Hợp chất có công thức (I) như được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19) và muối được dụng của chúng có thể được sử dụng làm

thuốc, chẳng hạn ở dạng dược phẩm để dùng qua đường tiêu hóa (đặc biệt là dùng qua đường miệng) hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa (bao gồm dùng tại chỗ hoặc dùng qua đường xông hít).

Việc sản xuất dược phẩm có thể được thực hiện theo cách mà chuyên gia bất kỳ trong lĩnh vực biết rõ (xem tài liệu Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (2005), Part 5, “Pharmaceutical Manufacturing” [published by Lippincott Williams & Wilkins] chẳng hạn) bằng cách đưa hợp chất có công thức (I) đã nêu hoặc muối dược dụng của nó, tùy ý kết hợp với các chất có giá trị điều trị khác, vào dạng sử dụng bào chế theo công thức đã biết cùng với các chất mang rắn hoặc lỏng phù hợp, không độc, trơ, tương thích để trị liệu và, nếu cần, các tá dược dược dụng thông thường.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng hợp chất có công thức (I) như được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19) với lượng có hoạt tính dược lý.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, lượng dược sử dụng bao gồm giữa 1 mg và 1000 mg mỗi ngày, cụ thể là giữa 5 mg và 500 mg mỗi ngày, cụ thể hơn là giữa 25 mg và 400 mg mỗi ngày, đặc biệt là giữa 50 mg và 200 mg mỗi ngày.

Để tránh nghi ngờ bất kỳ, nếu hợp chất được mô tả là hữu hiệu để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhất định, các hợp chất này cũng thích hợp để dùng trong bào chế thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đã nêu.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn như được nêu dưới đây ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân này sử dụng lượng có hoạt tính dược lý của hợp chất có công thức (I) như được xác định theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19) hoặc muối dược dụng của nó.

Hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), hoặc muối dược dụng của chúng, có thể được sử dụng để bào chế thuốc, và thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm các bệnh/rối loạn dị ứng/tự miễn mạn tính và cấp tính, bao gồm hen, hen do dị ứng, hen ưa eosin,

hen nặng, viêm mũi, viêm mũi dị ứng, phù mạch, dị ứng với nọc độc của côn trùng, dị ứng thuốc, viêm xoang dị ứng, viêm thận dị ứng, viêm màng kết dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền, hen phế quản, dị ứng thực phẩm, rối loạn tế bào bón toàn thân, sốc mẫn cảm, mày đay, eczema, viêm loét ruột kết, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh ruột viêm và viêm khớp dạng thấp; bệnh liên quan đến tế bào ưa eosin bao gồm chứng viêm mạch nhỏ như hội chứng Churg-Strauss, bệnh u hạt Wegener, viêm đa vi mạch (và các tập hợp con đặc hiệu của các tổ chức đa vi mạch), hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin như viêm phổi ưa eosin, viêm thực quản ưa eosin, viêm thực quản trào ngược, viêm màng trong tim ưa eosin (viêm màng trong tim Loeffler), hội chứng đau cơ ưa eosin, viêm bao cơ ưa eosin, viêm nang lông dạng mũ ưa eosin (bệnh Ofuji), loét ưa eosin, tăng sản mạch bạch huyết với bạch cầu ưa eosin (ALHE), viêm mô tế bào ưa eosin (hội chứng Wells), bệnh bạch cầu ưa eosin mạn tính và hội chứng DRESS (hội chứng phát ban do thuốc với tăng bạch cầu ưa eosin và những hội chứng toàn thân - Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms); và các bệnh liên quan đến tế bào ưa bazơ, bao gồm bệnh bạch cầu ưa bazơ và chứng tăng bạch cầu ưa bazơ.

Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), hoặc muối được dụng của chúng, có thể được sử dụng để bào chế thuốc, và thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm bệnh polyp mũi, bệnh Still (viêm khớp thiếu niên tự phát thể hệ thống) và xơ nang.

Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), hoặc muối được dụng của chúng, có thể được sử dụng để bào chế thuốc, và thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm hen, hen do dị ứng, hen ưa eosin, hen nặng, viêm mũi dị ứng, phù mạch, dị ứng với nọc độc của côn trùng, dị ứng thuốc, viêm xoang dị ứng, viêm thận dị ứng, viêm màng kết dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền, dị ứng thực phẩm, rối loạn tế bào bón toàn thân, sốc mẫn cảm, mày đay và eczema.

Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), hoặc muối được dụng của

chúng, có thể được sử dụng để bào chế thuốc, và thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm bệnh liên quan đến tế bào ưa eosin bao gồm chứng viêm mạch nhỏ giống hội chứng Churg-Strauss, bệnh u hạt Wegener, viêm đa vi mạch (và các tập hợp con đặc hiệu tổ chức của vi mạch), hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin tương tự viêm phổi ưa eosin, viêm thực quản ưa eosin, viêm thực quản trào ngược, viêm màng trong tim ưa eosin (viêm màng trong tim Loeffler), hội chứng đau cơ ưa eosin, viêm bao cơ ưa eosin, viêm nang lông dạng mũ ưa eosin (bệnh Ofuji), loét ưa eosin, tăng sản mạch bạch huyết với bạch cầu ưa eosin (ALHE), viêm mô tế bào ưa eosin (hội chứng Wells), bệnh bạch cầu ưa eosin mạn tính và hội chứng DRESS (hội chứng phát ban do thuốc với tăng bạch cầu ưa eosin và những hội chứng toàn thân).

Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), hoặc muối được dụng của chúng, có thể được sử dụng để bào chế thuốc, và thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm các bệnh liên quan đến ưa bazơ, bao gồm bệnh bạch cầu ưa bazơ và chứng tăng bạch cầu ưa bazơ.

Theo một phương án được ưu tiên nhất, hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19), hoặc muối được dụng của chúng, có thể được sử dụng để bào chế thuốc, và thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm hen, hen ưa eosin, viêm mũi dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền, bệnh polyp mũi, dị ứng thực phẩm (đặc biệt là dị ứng thực phẩm qua trung gian IgE), mày đay (đặc biệt là mày đay mạn tính), viêm thực quản ưa eosin, hội chứng Churg Strauss, hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin, viêm phổi ưa eosin (đặc biệt là viêm phổi ưa eosin mạn tính), hội chứng DRESS, bệnh Still, COPD và xơ nang (và đặc biệt là hen, hen ưa eosin, viêm mũi dị ứng, viêm da dị ứng do di truyền, dị ứng thực phẩm qua trung gian IgE, mày đay mạn tính, viêm thực quản ưa eosin và hội chứng Churg Strauss).

Bản mô tả mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19) để bào chế được phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh nêu trên.

Sáng chế cũng đề cập đến muối dược dụng và dược phẩm và chế phẩm chứa hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19).

Dược phẩm theo sáng chế chứa ít nhất một hợp chất có công thức (I) theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1) đến 19) (hoặc muối dược dụng của nó) làm hoạt chất và tùy ý chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược. Tham chiếu bất kỳ đến hợp chất có công thức (I), (I_{ST1}) hoặc (I_{ST2}) trong bản mô tả này được hiểu là cũng đề cập đến muối (và đặc biệt là muối dược dụng) của các hợp chất này, nếu phù hợp và có lợi. Những trường hợp ưu tiên được chỉ ra đối với hợp chất có công thức (I) đương nhiên là áp dụng sự thay đổi nếu cần thiết đối với hợp chất có công thức (I_{ST1}) và đối với hợp chất có công thức (I_{ST2}) cũng như đối với muối và muối dược dụng của hợp chất có công thức (I), có công thức (I_{ST1}) hoặc có công thức (I_{ST2}). Áp dụng tương tự cho các hợp chất này để dùng làm thuốc, cho dược phẩm chứa các hợp chất này ở dạng thành phần có hoạt tính hoặc cho việc sử dụng các hợp chất này để sản xuất thuốc để điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả.

Như được đề cập đến trước đây, hợp chất có công thức (I) đóng vai trò làm chất đối kháng PGD₂ điều biến hoạt tính của thụ thể CRTH2. Hiệu lực sinh học của các hợp chất này có thể được kiểm tra bằng nhiều thử nghiệm *in vitro*, *ex vivo* và *in vivo*. Khả năng gắn kết với thụ thể CRTH2 của hợp chất có công thức (I) có thể được xác định bằng phương pháp tương tự như phương pháp được mô tả trong tài liệu (Arimura A. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 298(2), 411-419; và Sawyer N. *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 137, 1163-1172, tương ứng) và bằng thử nghiệm được mô tả dưới đây trong phần thí nghiệm.

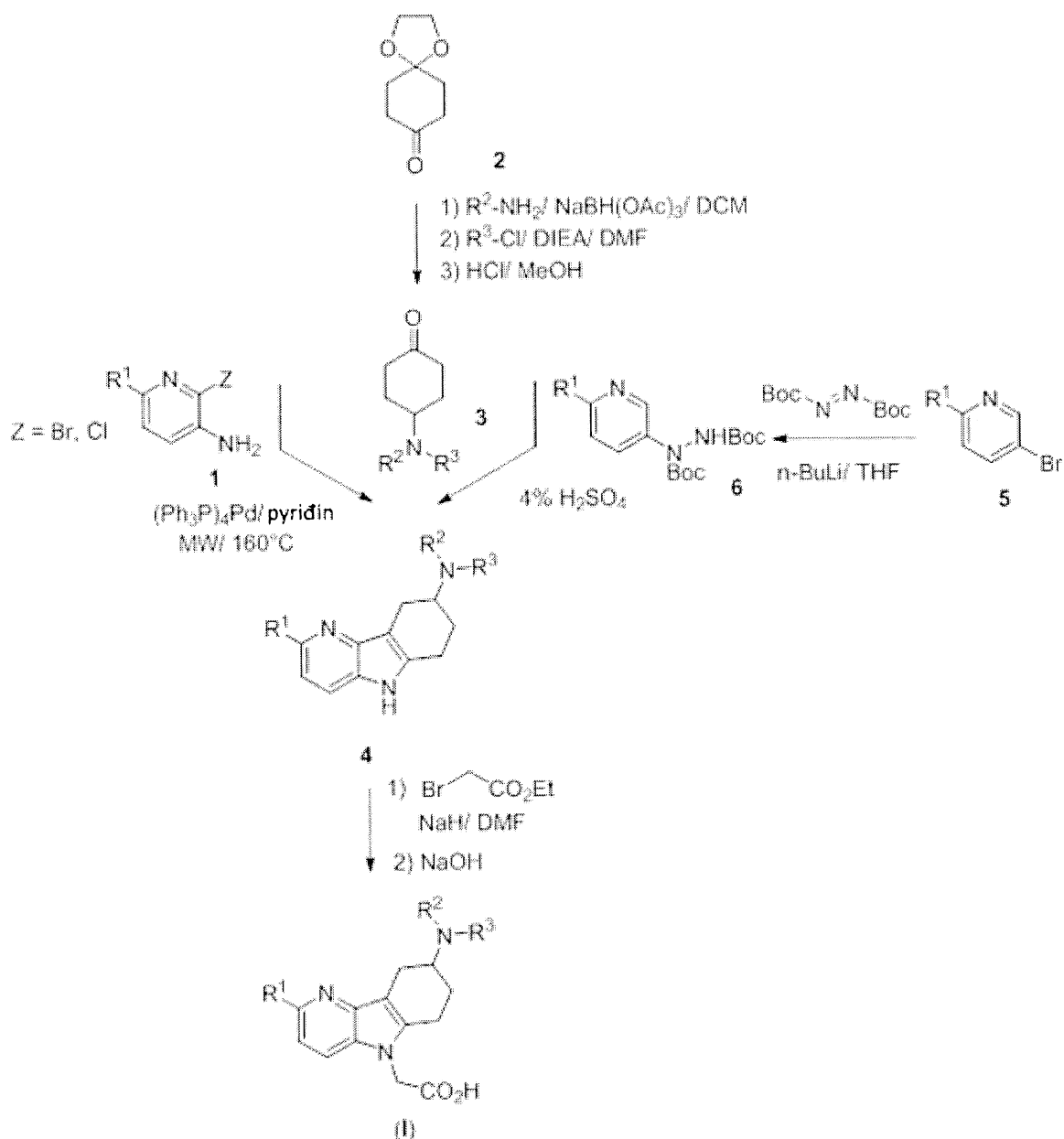
Một khía cạnh khác của sáng chế là quy trình điều chế hợp chất có công thức (I). Hợp chất theo công thức (I) của sáng chế có thể được điều chế theo chuỗi phản ứng được chỉ ra trong sơ đồ dưới đây trong đó R¹ và R² là như được xác định trong công thức (I). Các chữ viết tắt khác được sử dụng là như được xác định trong phần thí nghiệm.

Nói chung, tất cả các biến đổi hóa học có thể được thực hiện theo phương pháp tiêu chuẩn đã biết như được mô tả trong tài liệu, hoặc như được mô tả trong các

quy trình dưới đây. Hợp chất thu được cũng có thể được chuyển hóa thành muối được dụng của chúng theo cách đã biết.

Hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế từ dẫn xuất azaindol tương ứng (4) mà bản thân dẫn xuất này có thể được tổng hợp bằng cách chiếu xạ MW dẫn xuất 3-amino-2-bromo-pyridin or 3-amino-2-clo-pyridin tương ứng (1) với dẫn xuất 4-(5-clo-pyrimidin-2-yl)amino-xyclohexanon (3) với sự có mặt của chất xúc tác như $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ trong pyridin hoặc bằng cách cho dẫn xuất hydrazin được bảo vệ ở Boc tương ứng (6) phản ứng với dẫn xuất 4-(5-clo-pyrimidin-2-yl)amino-xyclohexanon (3) với sự có mặt của axit như axit sulfuric. Dẫn xuất hydrazin được bảo vệ ở Boc (6) có thể được điều chế bằng cách cho dẫn xuất bromo-pyridin tương ứng (5) phản ứng với di-tert-butyl-aza-dicarboxylat với sự có mặt của bazơ như butyllithi trong dung môi không proton như THF.

Dẫn xuất 4-(5-clo-pyrimidin-2-yl)amino-xyclohexanon (3) có thể được điều chế bằng cách amin hóa khử 1,4-dioxaspiro[4,5]đecan-8-on (2) sẵn có trên thị trường bằng amin $\text{R}^2\text{-NH}_2$ mong muốn với sự có mặt của chất khử như $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ trong dung môi không proton như DCM, sau đó phản ứng với 2,5-diclopyrimidin ($\text{R}^3\text{-Cl}$) với sự có mặt của bazơ như DIEA trong dung môi không proton như DMF, và loại bảo vệ axetal trong điều kiện axit như HCl trong metanol. Alkyl hóa dẫn xuất azaindol (4) bằng etyl bromoaxetat với sự có mặt của bazơ như NaH trong dung môi không proton như DMF sau đó xà phòng hóa với bazơ như NaOH tạo ra hợp chất có công thức (I).



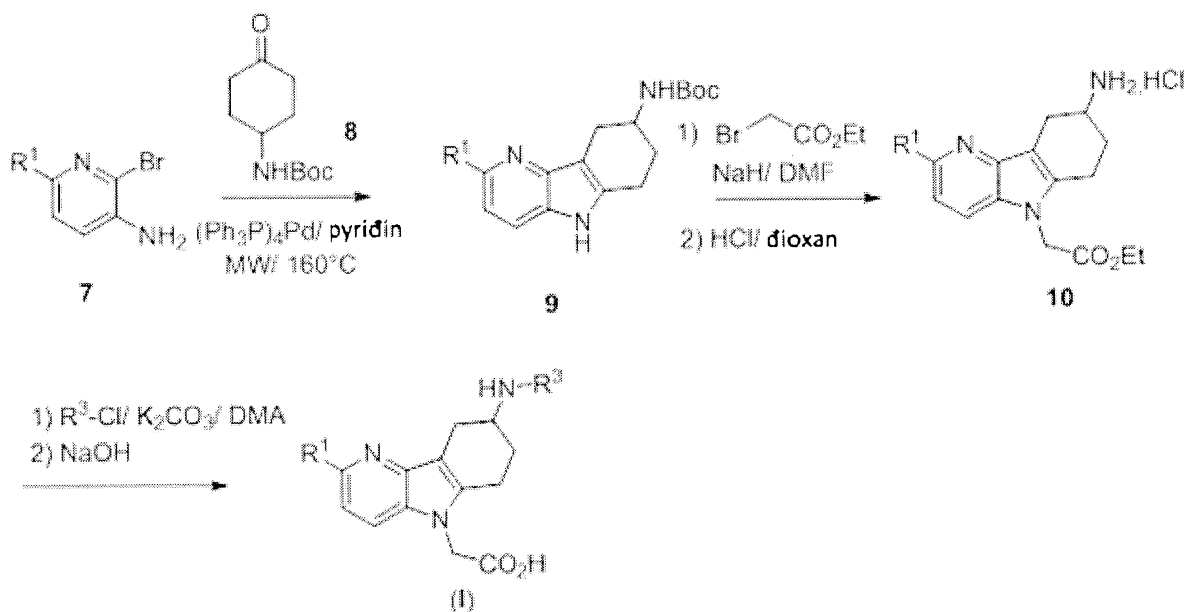
Sơ đồ 1: Quy trình tổng hợp chung để điều chế hợp chất có công thức (I)

(R^3 là 5-clo-pyrimidin-2-yl)

Theo cách khác, hợp chất có công thức (I) trong đó R^2 là hydro có thể được điều chế từ dẫn xuất azaindol tương ứng (9) mà bản thân dẫn xuất này có thể được tổng hợp bằng cách chiếu xạ MW 3-amino-2-bromo-pyridin (7) tương ứng bằng *tert*-butyl (4-oxocyclohexyl)carbamate (8) sẵn có trên thị trường với sự có mặt của chất xúc tác như $\text{Pd(Ph}_3\text{P)}_4$ trong pyridin.

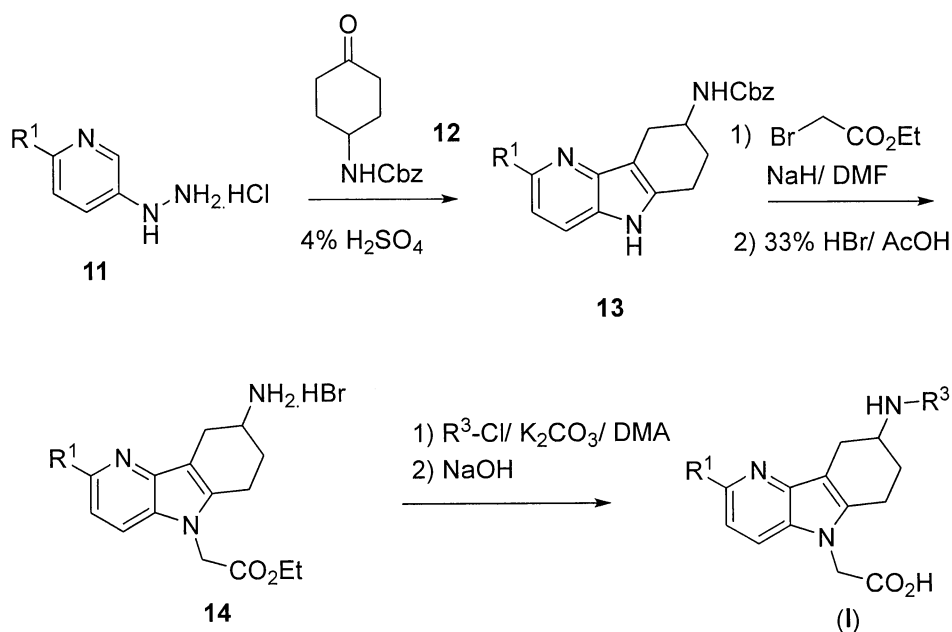
Alkyl hóa dẫn xuất azaindol (9) bằng etyl bromoaxetat với sự có mặt của bazơ như NaH trong dung môi không proton như DMF sau đó loại bảo vệ Boc bằng axit

như HCl trong đioxan thu được etyleste của axit azainđol axetic mong muốn (**10**). Phản ứng của amin (**10**) với 2,5-điclopyrimidin (R^3 -Cl) với sự có mặt của bazơ như K_2CO_3 trong dung môi không proton như DMA sau đó xà phòng hóa với bazơ như NaOH tạo ra hợp chất có công thức (**I**).



Sơ đồ 2: Quy trình tổng hợp chung để điều chế hợp chất có công thức (**I**) trong đó R^2 là hydro (R^3 là 5-clo-pyrimidin-2-yl)

Hợp chất có công thức (**I**) trong đó R^2 là hydro cũng có thể được điều chế từ dẫn xuất azainđol tương ứng (**13**) mà bản thân dẫn xuất này có thể được tổng hợp bằng cách cho dẫn xuất pyridin hydrazin hydroclorua (**11**) tương ứng sẵn có trên thị trường phản ứng với benzyl (4-oxocyclohexyl)carbamate (**12**) sẵn có trên thị trường với sự có mặt của axit như axit sulfuric. Alkyl hóa dẫn xuất azainđol (**13**) bằng etyl bromoaxetat với sự có mặt của bazơ như NaH trong dung môi không proton như DMF sau đó loại bỏ bảo vệ Cbz bằng axit như HBr trong axit axetic thu được etyleste của axit azainđol axetic mong muốn (**14**). Phản ứng của amin (**14**) với 2,5-điclopyrimidin (R^3 -Cl) với sự có mặt của bazơ như K_2CO_3 trong dung môi không proton như DMA sau đó xà phòng hóa với bazơ như NaOH tạo ra hợp chất có công thức (**I**).



Sơ đồ 3: Quy trình tổng hợp chung để điều chế hợp chất có công thức (I) trong đó R² là hydro (R³ là 5-clo-pyrimidin-2-yl)

Bất cứ khi nào hợp chất có công thức (I) hoặc hợp chất trung gian có cấu trúc 4, 9 và 13 thu được ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân đối ảnh, các chất đồng phân đối ảnh này có thể được tách bằng cách sử dụng các phương pháp mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết: chẳng hạn bằng cách tạo ra và phân tách muối không đối quang hoặc bằng HPLC trên pha tĩnh bất đối như cột Regis Whelk-O1(R,R) (10 μ m), cột Daicel ChiralCel OD-H (5-10 μ m), hoặc cột Daicel ChiralPak IA (10 μ m) hoặc cột AD-H (5 μ m). Các điều kiện điển hình của HPLC bất đối là hỗn hợp đẳng dòng gồm chất rửa giải A (EtOH, với sự có mặt hoặc không có mặt của amin như TEA và/hoặc DEA) và chất rửa giải B (hexan), ở tốc độ dòng là 0,8 đến 150 mL/phút.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các chữ viết tắt (như được sử dụng ở đây):

Ac	Axetyl
aq.	Chứa nước
APC	Allophycocyanin
Boc	tert-butoxycarbonyl

BSA	Albumin huyết thanh bò
Cbz	Benzyloxycarbonyl
d	Vạch đôi
DCM	Điclometan
DEA	Đietylamin
DIEA	<i>N,N</i> -Điisopropyletylamin
DMF	Đimetylformamit
DMA	Đimetylaxetamit
DMSO	Đimetylsulfoxit
dpm	phân rã trên phút
EA	etyl axetat
EDTA	axit etylen điamin tetraaxetic
eq	đương lượng
Et	etyl
FC	sắc ký nhanh
h	giờ
HEPES	axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonic
HPLC	sắc ký lỏng hiệu năng cao
HSA	albumin huyết thanh người
L	lít
LC-MS	sắc ký lỏng-phổ khối
m	Đa vạch
MeCN	axetonitril
MeOH	metanol

min	phút
Me	metyl
MS	phổ khối
MW	vi sóng
N	Trạng thái bình thường của dung dịch
PBS	muối đệm phosphat
PEI	Polyetylenimin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
Ph	Phenyl
RT	nhiệt độ trong phòng
s	giây
sat	bão hòa
tBu	tert-butyl
TEA	triethylamin
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
t _R	thời gian lưu
Tris	dung dịch đệm tris-(hydroxymetyl)aminometan

Hóa học

Lưu ý chung

Tất cả các dung môi và chất phản ứng được sử dụng như thu được từ các nguồn thương mại trừ khi được chỉ ra theo cách khác.

Nhiệt độ được chỉ ra ở dạng độ bách phân (°C). Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng (RT).

Trong hỗn hợp, mối tương quan giữa các phần của hỗn hợp dung môi hoặc chất rửa giải hoặc chất phản ứng ở dạng lỏng được nêu dưới dạng tương quan theo thể tích (v/v), trừ khi được chỉ ra theo cách khác.

Điều kiện đối với HPLC phân tích như được sử dụng trong phần ví dụ dưới đây:

Phân tích HPLC/MS được thực hiện trên hệ thống Agilent 1100, được lắp với bơm hai thành phần Dionex P580, bộ phát hiện dây diot quang Dionex PDA-100 và thiết bị phổ khối Finnigan AQA.

Thời gian lưu LC thu được bằng cách sử dụng điều kiện rửa giải sau:

- HPLC phân tích trên cột Zorbax® SB-AQ (4,6x50 mm, 3,5 µm, Agilent); Gradient tuyến tính gồm nước/ 0,04% TFA (A) và MeCN (B) từ 5% đến 95% B trong 1,5 phút; tốc độ dòng 4,5 mL/phút, phát hiện ở 210 nm.

Tinh chế bằng HPLC điều chế/MS (điều kiện axit) được thực hiện trên hệ thống bơm kép gradient cao áp Gilson 333/334 với bộ phận lấy mẫu tự động Gilson 215 và bộ phận gom các phân đoạn, bộ phát hiện Dionex UVD340U DAD, bộ phát hiện polymerlabs PL-ELS 1000 ELS và bộ phát hiện Thermo MSQ Plus MS, bằng cách sử dụng cột Waters Atlantis T3 (10 µm, 30 × 75 mm), với gradient tuyến tính gồm nước/ 0,5% axit formic (B) và MeCN (A) bắt đầu từ 80/20 đến 5/95 (B)/(A) trong 5 phút; tốc độ dòng 75 mL/phút.

Tinh chế bằng HPLC điều chế/MS (điều kiện bazơ) được thực hiện trên hệ thống bơm kép gradient cao áp Gilson 333/334 với bộ phận lấy mẫu tự động Gilson 215 và bộ phận gom các phân đoạn, bộ phát hiện Dionex UVD340U DAD, bộ phát hiện polymerlabs PL-ELS 1000 ELS và bộ phát hiện Thermo MSQ Plus MS, bằng cách sử dụng cột Waters XBridge C18 (10 µm, 30 × 75 mm), với gradient tuyến tính gồm nước/ 0,5% NH₄OH 25% (B) và MeCN (A) bắt đầu từ 80/20 đến 5/95 (B)/(A) trong 5 phút; tốc độ dòng 75 mL/phút.

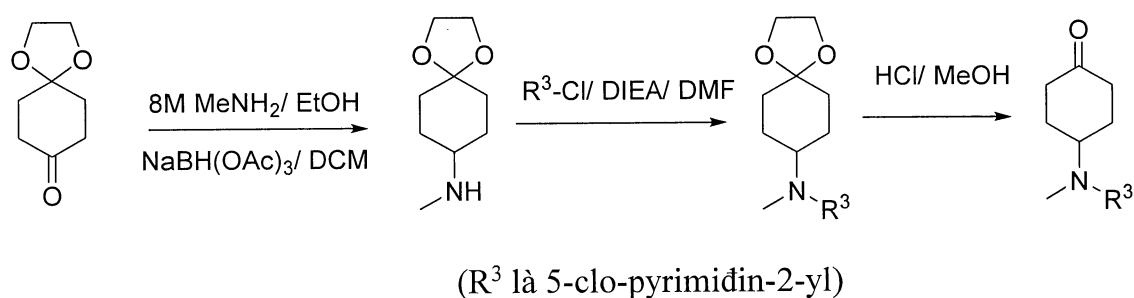
HPLC phân tích trên pha tĩnh bất đối được thực hiện trên cột Daicel ChiralPak AD-H (4,6 X 250 mm, 5 µm) hoặc cột Chiralpak AY-H (4,6 X 250 mm, 5 µm). Điều kiện điển hình của HPLC bất đối là hỗn hợp đẳng dòng gồm 30% heptan + 0,05%

DEA và 70% EtOH + 0,05% DEA, ở tốc độ dòng 0,8 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-1) hoặc hỗn hợp đẳng dòng gồm 40% heptan và 60% EtOH + 0,1% TFA, ở tốc độ dòng 1,0 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-2) hoặc hỗn hợp đẳng dòng gồm 50% heptan + 0,05% DEA và 50% EtOH + 0,05% DEA, ở tốc độ dòng 0,8 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-3), hoặc hỗn hợp đẳng dòng gồm 20% heptan và 80% EtOH + 0,1% TFA ở tốc độ dòng 0,8 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-4).

HPLC điều chế trên pha tĩnh bất đối được thực hiện trên cột Daicel ChiralPak AD-H (20 X 250 mm, 5 μ m). Các điều kiện điển hình của HPLC bất đối là hỗn hợp đẳng dòng gồm 50% EtOH và 50% heptan ở tốc độ dòng 16 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-5) hoặc hỗn hợp đẳng dòng gồm 50% EtOH + 0,05% DEA và 50% heptan ở tốc độ dòng 34 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-6) hoặc hỗn hợp đẳng dòng gồm 50% EtOH + 0,1% DEA và 50% heptan, ở tốc độ dòng 16 mL/phút, phát hiện ở 210 nm (HPLC bất đối-7).

A.1 Tổng hợp dẫn xuất axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic

A.1.1. Tổng hợp 4-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)xyclohexanon



Bổ sung lần lượt metyl amin (8M trong EtOH, 1 đương lượng) và NaBH(OAc)₃ (1,5 đương lượng) vào dung dịch chứa 1,4-đioxaspiro[4,5]đecan-8-on (1 đương lượng) sẵn có trên thị trường trong DCM (20 ml/ 10 mmol) ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được để ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 2h. Hỗn hợp phản ứng được đổ vào dung dịch NaHCO₃ bão hòa, lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng MgSO₄ và được làm bay hơi trong chân không để thu được

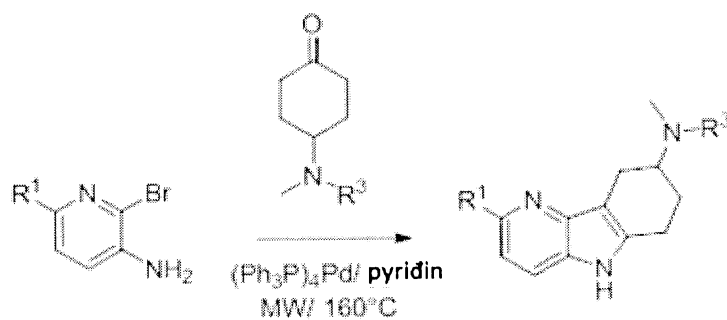
N-metyl-1,4-dioxaspiro[4,5]đecan-8-amin, được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bổ sung DIEA (2 đương lượng) và 2,5-điclopyrimidin (1,05 đương lượng) vào dung dịch chứa *N*-metyl-1,4-dioxaspiro[4,5]đecan-8-amin (1 đương lượng) trong DMF (10,5 ml/ 6 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 90°C qua đêm. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung isopropyl axetat vào. Hỗn hợp được rửa bằng nước và dung dịch nước axit xitric 10%. Lớp hữu cơ được làm khô (MgSO₄) và cô đặc trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng FC (0 đến 15% EA trong heptan) để tạo ra hợp chất trung gian mong muốn ở dạng chất rắn.

Dung dịch chứa hợp chất trung gian này (1 đương lượng) trong hỗn hợp gồm 2N HCl (2,7 ml/ 5 mmol) và MeOH (2,7 ml/ 5 mmol) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Lớp nước được chiết bằng DCM. Lớp hữu cơ được làm khô (MgSO₄) và cô đặc trong chân không. Phần còn lại ở dạng thô được tinh chế bằng FC (0 to 17% EA trong heptan) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn.

LC-MS: $t_R = 0,78$ phút; $[M+H]^+ = 240,2$

A.1.2. Tổng hợp dẫn xuất *N*-(5-clopyrimidin-2-yl)-*N*-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-amin (phương pháp A)



(R³ là 5-clo-pyrimidin-2-yl)

Quy trình chung:

Dung dịch chứa dẫn xuất 3-amino-2-bromo-pyridin tương ứng (1 đương lượng), 4-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)xyclohexanon (1,2 đương lượng), (Ph₃P)₄Pd (0,05 đương lượng), và pyridin (8,17 đương lượng) được kết hợp vào một

lọ. Lọ này được chiếu xạ bằng MW ở 160°C trong 1 giờ. Bổ sung một lần nữa (Ph₃P)₄Pd (0,025 đương lượng) vào và chiếu xạ lại hỗn hợp phản ứng bằng MW ở 160°C trong 30 phút. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được kết hợp với nước và được chiết hai lần bằng DCM. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được làm khô (MgSO₄), được lọc và cô trong chân không.

Phần còn lại được tinh chế bằng HPLC điều chế (điều kiện bazơ) để thu được sản phẩm mong muốn.

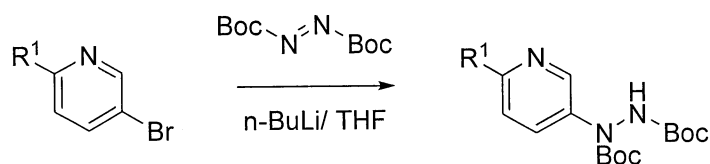
Các dẫn xuất *N*-(5-clopyrimidin-2-yl)-*N*-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-amin được tổng hợp theo quy trình chung nêu trên.

Bảng 1

R ¹	Tên	[M+H] ⁺ m/z	t _R [phút] LC-MS
Me	<i>N</i> -(5-clopyrimidin-2-yl)- <i>N</i> ,2-dimetyl-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amin	328,11	0,66
F	<i>N</i> -(5-clopyrimidin-2-yl)-2-flo- <i>N</i> -metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amin	332,09	0,87
CF ₃	<i>N</i> -(5-clopyrimidin-2-yl)- <i>N</i> -metyl-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amin	381,99	0,94

A.1.3. Tổng hợp dẫn xuất *N*-(5-clopyrimidin-2-yl)-*N*-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-amin (phương pháp B)

A.1.3.1 Tổng hợp di-*tert*-butyl 1-(pyridin-3-yl)hydrazin-1,2-đicarboxylat



Quy trình chung:

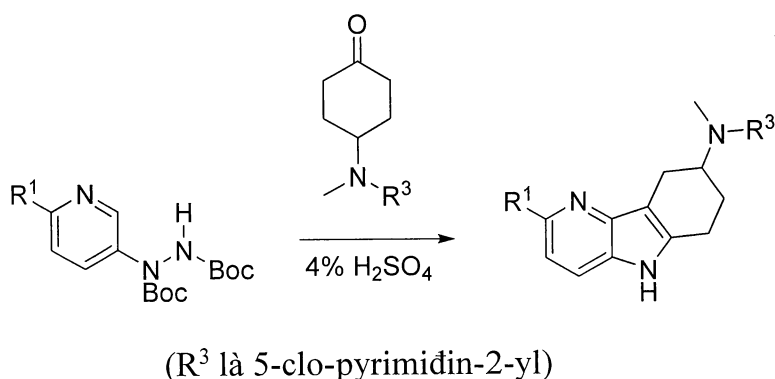
Dung dịch chứa dung dịch butyllithi 1,6M trong hexan (1,1 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt ở -40°C vào dung dịch chứa dẫn xuất 3-bromo-pyridin tương ứng (1 đương lượng) trong diethylete (14,5 đương lượng) trong môi trường khí quyển chứa N₂. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút ở -40°C và sau đó dung dịch

chứa di-tert-butyl-azodicarboxylat (1,1 đương lượng) trong THF (18,5 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở -40°C trong 30 phút và được để ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Nước được bổ sung vào, sau đó bổ sung DCM. Pha hữu cơ được tách và được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và cô đặc trong chân không. Phần còn lại được tinh chế bằng FC (EA/n-heptan: 2/8) để thu được sản phẩm mong muốn.

Dẫn xuất di-tert-butyl 1-(pyridin-3-yl)hydrazin-1,2-dicarboxylat được tổng hợp theo quy trình chung nêu trên

R^1	Tên	$[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z	t_{R} [phút] LC- MS
OMe	di-tert-butyl 1-(6-metoxypyridin-3-yl)hydrazin-1,2-dicarboxylat	340,16	0,88
F	di-tert-butyl 1-(6-flopyridin-3-yl)hydrazin-1,2-dicarboxylat	328,12	0,88

A.1.3.2 Tổng hợp dẫn xuất *N*-(5-clopyrimidin-2-yl)-*N*-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-amin



Quy trình chung:

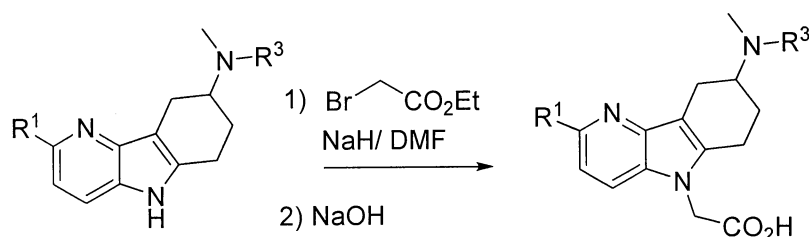
Dung dịch chứa dẫn xuất di-tert-butyl 1-(pyridin-3-yl)hydrazin-1,2-dicarboxylat tương ứng (1 đương lượng), 4-((5-clopyrimidin-2-

yl)(metyl)amino)xyclohexanon (1 đương lượng) trong dung dịch nước H₂SO₄ 4% (10mL/0,04 mol) được khuấy ở 100°C trong 2h30. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được kết hợp với dung dịch NaHCO₃ bão hòa và được chiết bằng EA. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được làm khô (MgSO₄), được lọc và cô đặc trong chân không. Phần còn lại được tinh chế bằng HPLC điều chế (điều kiện bazơ) để thu được sản phẩm mong muốn

Các dẫn xuất *N*-(5-clopyrimidin-2-yl)-*N*-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-amin được tổng hợp theo quy trình chung nêu trên.

R ¹	Tên	[M+H] ⁺ m/z	t _R [phút] LC- MS
OMe	<i>N</i> -(5-clopyrimidin-2-yl)-2-metoxi- <i>N</i> -metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amin	344,12	0,67
F	<i>N</i> -(5-clopyrimidin-2-yl)-2-flo- <i>N</i> -metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amin	332,03	0,87

A.1.3. Tổng hợp dẫn xuất axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic



(R³ là 5-clo-pyrimidin-2-yl)

Quy trình chung:

Bổ sung NaH (1,1 đương lượng, thê phân tán 60% trong dầu khoáng) vào dung dịch đã được làm lạnh (0°C) chứa dẫn xuất *N*-(5-clopyrimidin-2-yl)-*N*-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-amin thích hợp (1 đương lượng) trong DMF khan (0,2 mL/0,08 mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 10 phút, bổ

sung etyl bromoacetat (1,1 đương lượng) vào và để ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Bổ sung nước (0,07 mL) và dung dịch nước NaOH 30% (0,07 ml) vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 50°C trong 2h và sau đó bổ sung dung dịch nước HCl 37% (0,07 mL) vào. Sản phẩm được tinh chế ngay lập tức bằng HPLC điều chế (điều kiện bazơ) để thu được hợp chất cuối cùng.

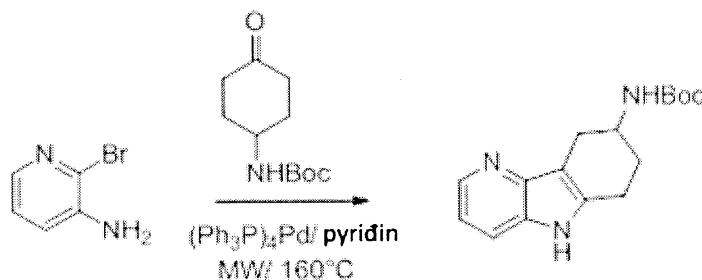
Điều chế các hợp chất nêu trong ví dụ

Dẫn xuất axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic sau đây được tổng hợp theo quy trình chung nêu trên.

Bảng 2

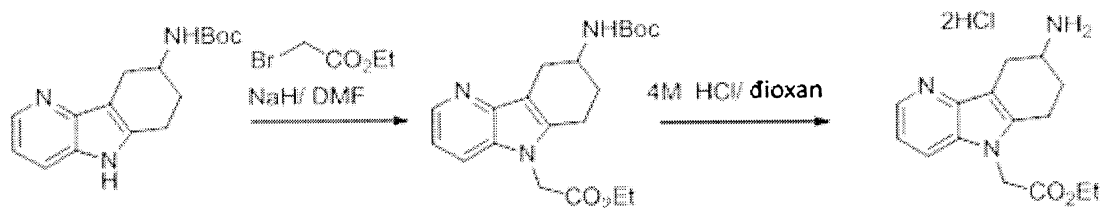
Ví dụ	Tên	[M+H] ⁺ m/z	t _R [phút] LC-MS
1	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-5-yl)axetic	386,01	0,64
2	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-5-yl)axetic	390,02	0,83
3	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-5-yl)axetic	402,05	0,66
4	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-5-yl)axetic	440,0	0,89

A.2 Tổng hợp dẫn xuất axit 2-(8-(5-clopyrimidin-2-ylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic

A.2.1 Tổng hợp *tert*-butyl (6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-yl)carbamate

Dung dịch chứa 3-amino-2-bromopyridin (1,0 g, 5,78 mmol, 1,0 đương lượng), *tert*-butyl (4-oxocyclohexyl)carbamate (1,48 g, 6,94 mmol, 1,2 đương lượng), $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (334 mg, 0,289 mmol, 0,05 đương lượng), và pyridin (3,8 ml, 47,2 mmol, 8,17 đương lượng) được kết hợp vào trong một lọ. Gia nhiệt lọ này bằng MW ở 160°C trong 2h30. Kết hợp hỗn hợp phản ứng với dung dịch NaHCO_3 bão hòa và chiết bằng EA. Rửa lớp hữu cơ bằng nước, nước muối, làm khô (MgSO_4), lọc và cô đặc trong chân không. Nghiền phần còn lại với diethyl ete và thu hồi bằng cách lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu be.

LC-MS: $t_R = 0,59$ phút; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 288,27$.

A.2.2 Tổng hợp etyl 2-(8-amino-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat (muối hydroclorua)

Bổ sung NaH (37 mg, 1,54 mmol, 1,1 đương lượng, thể phân tán 60% trong dầu khoáng) vào dung dịch đã được làm lạnh (0°C) chứa *tert*-butyl (6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]indol-8-yl)carbamate (403 mg, 1,4 mmol, 1,0 đương lượng) trong DMF khan (3,8 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 10 phút, bổ sung etyl bromoacetate (0,16 mL, 1,4 mmol, 1,0 đương lượng) vào và để ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Bổ sung nước vào và chiết hỗn hợp phản ứng hai lần bằng EA. Rửa dịch chiết hữu cơ kết hợp bằng nước, nước

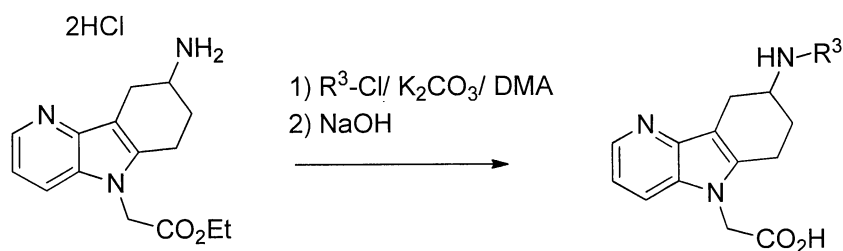
muối, làm khô (MgSO_4), lọc và cô đặc trong chân không. Tinh chế phần còn lại bằng HPLC điều chế (điều kiện axit) để thu được sản phẩm mong muốn.

LC-MS: $t_R = 0,67$ phút; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 373,96$.

Bổ sung HCl trong đioxan (4M, 0,21 ml, 0,85 mmol, 14 đương lượng) vào ethyl 2-(8-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat (23 mg, 0,06 mmol, 1,0 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tiếp theo, cô đặc hỗn hợp phản ứng trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này, hợp chất này được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC-MS: $t_R = 0,37$ phút; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 273,91$

A.2.3 Tổng hợp dẫn xuất axit 2-(8-(5-clopyrimidin-2-ylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic



Quy trình chung:

Khuấy hỗn hợp gồm ethyl 2-(8-amino-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat (muối hydroclorua) (0,06 mmol), 2,5-điclopyrimidin (0,06 mmol), và K_2CO_3 (0,25 mmol) trong DMA (0,4 mL) ở 80°C trong 12 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung nước (0,06 mL) và dung dịch nước NaOH 30% (0,06 mL) vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 50°C trong 2 giờ và sau đó bổ sung dung dịch nước HCl 37% (0,06 mL) vào. Sản phẩm được tinh chế ngay lập tức bằng HPLC (điều kiện bazơ) để thu được hợp chất cuối cùng ở dạng chất rắn màu trắng.

Điều chế các hợp chất nêu trong ví dụ

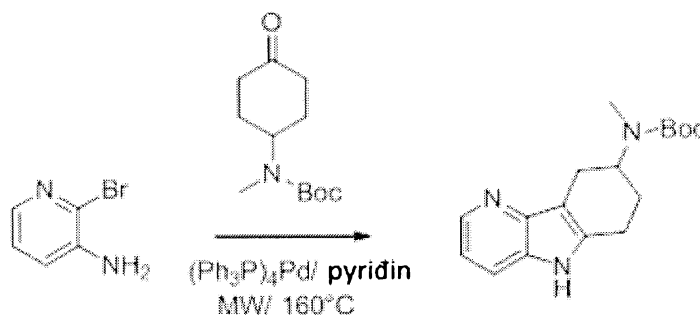
Dẫn xuất axit 2-(8-(5-clopyrimidin-2-ylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic sau đây được tổng hợp theo quy trình chung nêu trên.

Bảng 3

Ví dụ	Tên	[M+H] ⁺ m/z	t _R [phút] LC-MS
5	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2- <i>b</i>]indol-5-yl)axetic	358,1	0,56

A.3 Tổng hợp axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic

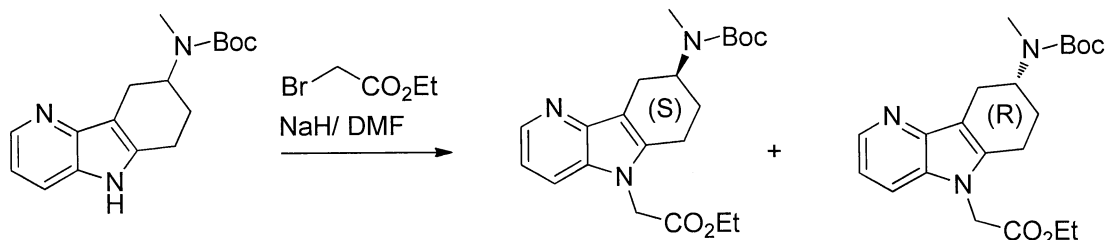
A.3.1 Tổng hợp *tert*-butyl metyl(6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-8-yl)carbamate



Hòa tan 3-amino-2-bromopyridin (2,0 g, 11,6 mmol, 1,0 đương lượng), 4-(N-Boc-N-methylamino)cyclohexanon (3,15 g, 13,9 mmol, 1,2 đương lượng), và (Ph₃P)₄Pd (668 mg, 0,58 mmol, 0,05 đương lượng) trong pyridin (7,6 ml) trong một lọ. Gia nhiệt lọ bằng chiếu xạ bằng MW ở 160°C trong 60 phút. Đổ hỗn hợp phản ứng vào nước (9,5 mL) và thu hồi chất rắn tạo thành bằng cách lọc, làm khô, nghiền trong diethyl ete và thu hồi lại bằng cách lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này.

LC-MS: $t_R = 0,63$ phút; $[M+H]^+ = 302,15$.

A.3.2 Tổng hợp (S)-etyl 2-(8-((*tert*-butoxycarbonyl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat và (R)-etyl 2-(8-((*tert*-butoxycarbonyl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat



Bổ sung NaH (120 mg, 5,02 mmol, thể phân tán 60% trong dầu khoáng) vào dung dịch đã được làm lạnh (0°C) chứa *tert*-butyl metyl(6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-8-yl)carbamate (1,37 g, 4,56 mmol) trong DMF khan (12,5 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 10 phút, bổ sung etyl bromoaxetat (0,52 mL, 4,56 mmol) vào và để ấm hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Bổ sung nước vào và thu hồi kết tủa tạo thành bằng cách lọc và rửa bằng nước. Tinh chế chất rắn thô bằng FC (8% MeOH trong DCM) sau đó lọc bằng diethyl ete để thu được sản phẩm mong muốn ở dạng raxemat.

LC-MS: $t_R = 0,7$ phút/ $[M+H]^+ = 388,50$

Tách hai chất đồng phân đối ảnh của sản phẩm thu được bằng HPLC điều chế bất đối (HPLC bất đối-5):

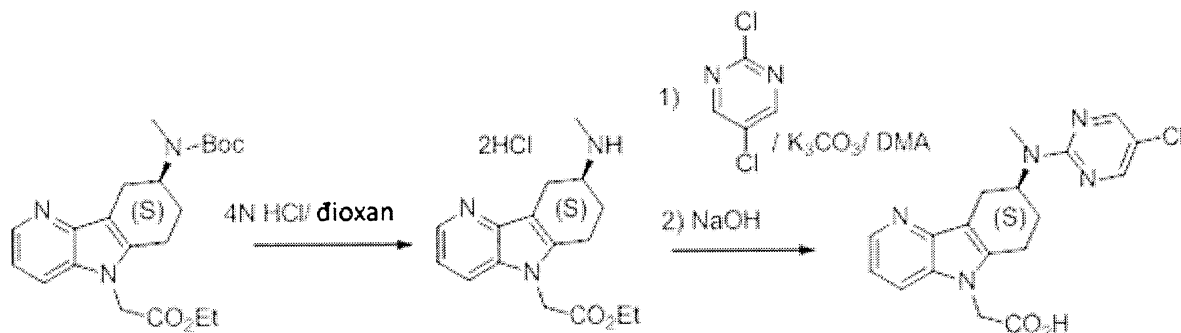
(R)-etyl 2-(8-((*tert*-butoxycarbonyl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat

(487 mg, 28%): HPLC (HPLC bất đối-1): $t_R = 6,03$ phút;

(S)-etyl 2-(8-((*tert*-butoxycarbonyl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat

(491 mg, 28%): HPLC (HPLC bất đối-1): $t_R = 7,36$ phút.

A.3.3. Tổng hợp axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic (ví dụ 6)



Bổ sung HCl 4N trong đioxan (0,895 mL) vào (S)-ethyl 2-(8-((*tert*-butoxycarbonyl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat (100 mg, 0,258 mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở RT trong 1h và cô đặc để thu được sản phẩm mong muốn ở dạng muối hydroclorua, muối này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC-MS: t_R : 0,38 phút/ $[M+H]^+$: 288,25.

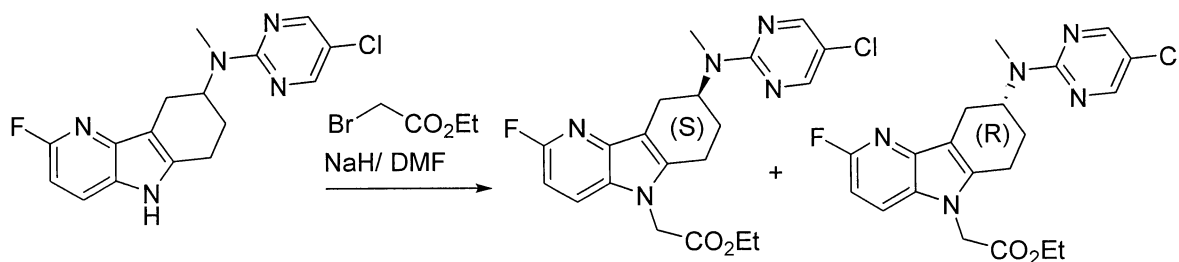
Bổ sung 2,5-điclopyrimidin (38,5 mg, 0,26 mmol) và K_2CO_3 (143 mg, 1,03 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian này (93 mg, 0,26 mmol) trong DMA (1,8 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 80°C trong 20h. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, bổ sung nước (0,26 mL) và dung dịch nước NaOH 30% (0,26 mL) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 50°C trong 2h. Tiếp theo, bổ sung dung dịch nước HCl 37% (0,26 mL) vào, và lọc kết tủa tạo thành và tinh chế bằng HPLC điều chế (điều kiện bazơ) để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng.

LC-MS: t_R : 0,61 phút/ $[M+H]^+$: 372,18.

HPLC (HPLC bất đối-2): t_R : 7,87 phút.

A.4 Tổng hợp axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetic

A.4.1 Tổng hợp (S)-ethyl 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat và (R)-ethyl 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat



Bổ sung cẩn thận NaH 95% (56,1 mg, 2.22 mmol, 1,2 đương lượng) vào dung dịch đã được làm lạnh (0°C) chứa N-(5-clopyrimidin-2-yl)-2-flo-N-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-8-amin (614 mg, 1,85 mmol, 1 đương lượng) trong DMF (6,36 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 20 phút. Bổ sung từ từ ethyl bromoaxetat (0,233 mL, 2,04 mmol, 1,1 đương lượng) vào và để hỗn hợp phản ứng ấm ở RT và khuấy trong 2h. Hòa tan hỗn hợp phản ứng trong EA, và rửa bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa. Làm khô dịch chiết hữu cơ bằng MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Tinh chế phần còn lại bằng FC (n-heptan đến n-heptan/EA: 7/3) để thu được sản phẩm mong muốn ở dạng raxemat.

LC-MS: t_R: 0,96 phút/ [M+H]⁺: 418,01

Tách hai chất đồng phân đối ảnh của sản phẩm thu được bằng HPLC điều chế bất đối (HPLC bất đối-6):

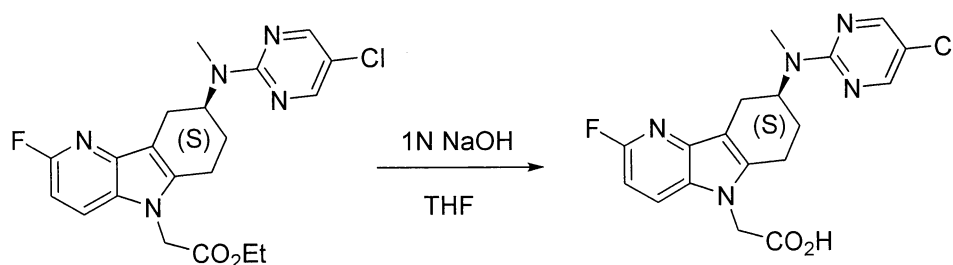
(S)-etyl 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat

(271 mg, 35%): HPLC (HPLC bất đối-3): t_R: 6,22 phút;

(R)-etyl 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat

(273 mg, 35%): HPLC (HPLC bất đối-3): t_R: 7,66 phút.

A.4.2 Tổng hợp axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (ví dụ 7)



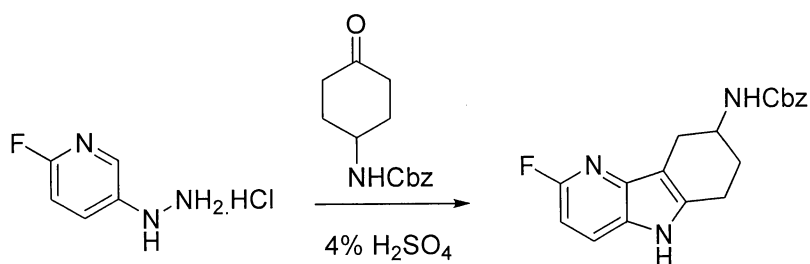
Bổ sung NaOH 1N (10 mL, 10 mmol, 15,42 đương lượng) vào dung dịch chứa (S)-ethyl 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat (271 mg, 0,649 mmol, 1 đương lượng) trong THF (10 mL) ở RT. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở RT trong 1h. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong chân không để loại bỏ chỉ THF. Tiếp theo axit hóa hỗn hợp bằng HCl đậm đặc đến độ pH~5-6 và khuấy ở RT. Chiết huyền phù bằng EtOAc (4 lần). Làm khô lớp hữu cơ gộp lại bằng MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu be (255 mg, 100%).

LC-MS: t_R : 0,82 phút/ $[M+H]^+$: 390,12

HPLC (HPLC bất đối-2): t_R : 4,96 phút.

A.5 Tổng hợp axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic

A.5.1 Tổng hợp benzyl (2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-8-yl)carbamat

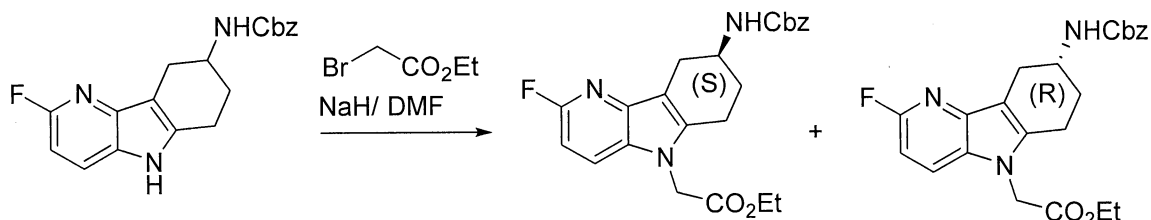


Dung dịch chứa 2-flo-5-hydrazinylpyridin hydroclorua (200 mg, 1 đương lượng), benzyl (4-oxocyclohexyl)carbamate (296 mg, 1 đương lượng) trong dung dịch nước H₂SO₄ 4% (3,3 mL) được khuấy ở 80°C trong 16h. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được kết hợp với dung dịch NaHCO₃ bão hòa và được chiết bằng EA. Làm khô (MgSO₄), lọc và cô đặc dịch chiết hữu cơ kết hợp

trong chân không để thu được sản phẩm mong muốn (305 mg, 77%), sản phẩm này được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC-MS: t_R : 0,82 phút/ $[M+H]^+$: 340,13.

A.5.2 Tổng hợp (S)-etyl-2-(8-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat và (R)-etyl-2-(8-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat



Bổ sung cẩn thận NaH 95% (20,8 mg, 2,22 mmol, 1,2 đương lượng) vào dung dịch đã được làm lạnh (0°C) chứa benzyl (2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-8-yl)carbamate (295 mg, 1,85 mmol, 1 đương lượng) trong DMF (6,36 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 10 phút. Bổ sung từ từ ethyl bromoacetate (0,086 mL, 1,1 đương lượng) vào và để hỗn hợp phản ứng ấm ở RT và khuấy trong 4h30. Bổ sung một lượng NaH 95% nữa (3,5 mg, 0,2 đương lượng) sau đó bổ sung ethyl bromoacetate (0,016 mL, 0,2 đương lượng). Khuấy phản ứng ở RT trong 16h. Tiếp theo, hòa tan hỗn hợp phản ứng trong EA, và rửa bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa. Làm khô dịch chiết hữu cơ bằng MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Tinh chế phần còn lại bằng FC (n-heptan đến n-heptan/EA: 1/1) để thu được sản phẩm mong muốn ở dạng raxemat (150mg, 50%).

LC-MS: t_R : 0,9 phút/ $[M+H]^+$: 426,15

Tách hai chất đồng phân đối ảnh của sản phẩm thu được bằng HPLC điều chế bất đối (HPLC bất đối-7):

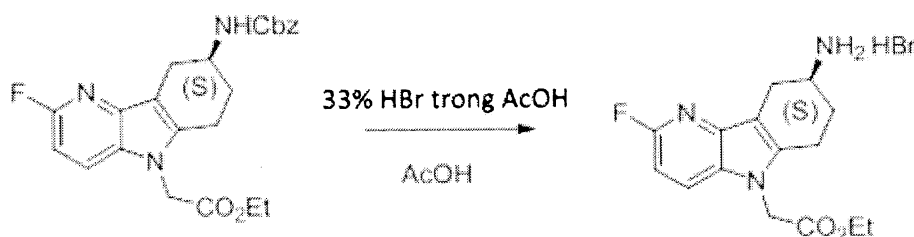
(R)-etyl-2-(8-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-*b*]indol-5-yl)axetat

(67 mg, 23%): HPLC (HPLC bất đối-3): t_R : 5,96 phút;

(S)-etyl-2-(8-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat

(86 mg, 29%): HPLC (HPLC bất đối-3): t_R : 7,27 phút.

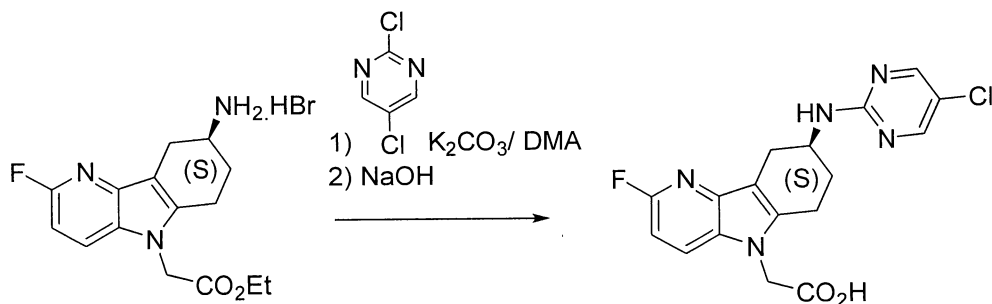
A.5.3 Tổng hợp (S)-etyl-2-(8-amino-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat (muối hydrobromua)



Bổ sung HBr 33% trong axit axetic (0,22 mL) vào dung dịch chứa (S)-etyl-2-(8-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat (42 mg, 1 đương lượng) trong axit axetic (1 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng được ở RT trong 1h và cô đặc trong chân không để thu được sản phẩm nêu ở đề mục (94 mg, 100%), sản phẩm này được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm

LC-MS: t_R : 0,55 phút/ $[M+H]^+$: 292,12

A.5.4 Tổng hợp axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic (ví dụ 8)



Bổ sung lần lượt 2,5-điclopyrimidin (15,6 mg, 1,4 đương lượng) và K_2CO_3 khan (41,5 mg, 4 đương lượng) vào dung dịch chứa (S)-etyl-2-(8-amino-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetat (muối hydrobromua) (48 mg, 1

đương lượng) trong DMA (1 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 80°C trong 16h. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, đổ hỗn hợp phản ứng vào nước và chiết bằng EA. Làm khô dịch chiết hữu cơ kết hợp bằng MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Tinh chế phần còn lại bằng HPLC điều chế (điều kiện axit) để thu được hợp chất trung gian etyl este (9 mg, 30%).

LC-MS: t_R : 0,88 phút/ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 404,05

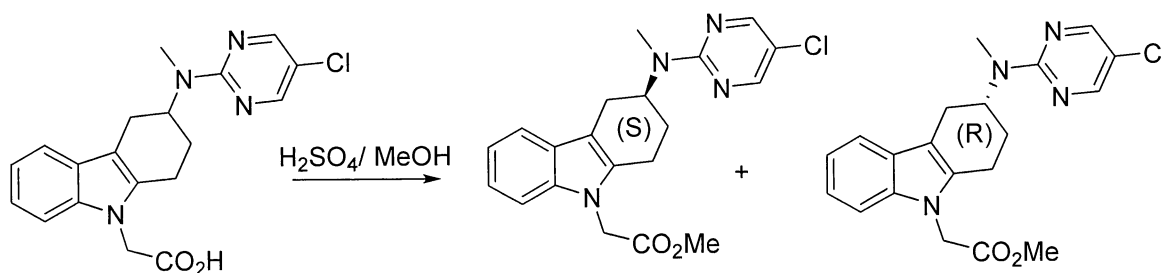
Bổ sung NaOH 1N (0,5 mL) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian etyl este (9 mg, 1 đương lượng) trong THF (0,5 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở RT trong 1h, axit hóa cho đến độ pH 1-2 bằng dung dịch HCl 1N và chiết bằng EA. Làm khô dịch chiết hữu cơ kết hợp bằng MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu be (6 mg, 24%).

LC-MS: t_R : 0,75 phút/ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 376,18

HPLC (HPLC bất đối-4): t_R : 6,6 phút.

A.6 Tổng hợp axit (S)-2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-3,4-đihydro-1H-carbazol-9(2H)-yl)axetic (ví dụ tham chiếu 1)

A.6.1 Tổng hợp (S)-metyl 2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)axetat và (R)-metyl 2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)axetat



Bổ sung H_2SO_4 đậm đặc (0,2 đương lượng) vào dung dịch chứa axit 2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-3,4-đihydro-1H-carbazol-9(2H)-yl)axetic (được mô tả như ví dụ 53 trong WO 2011/117798) (100 mg, 0,27 mmol) trong MeOH (1 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ hồi lưu trong 2h. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong chân không và phần còn lại được kết hợp với dung dịch NaHCO_3 bão hòa và

chiết bằng EA. Rửa dịch chiết hữu cơ kết hợp bằng nước muối, làm khô bằng MgSO_4 và làm bay hơi trong chân không để thu được sản phẩm mong muốn ở dạng raxemat (86 mg, 83%).

LC-MS: t_R : 1,01 phút/ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 385,10

Tách hai chất đồng phân đối ảnh của sản phẩm thu được bằng HPLC điều chế bất đối (HPLC bất đối-5):

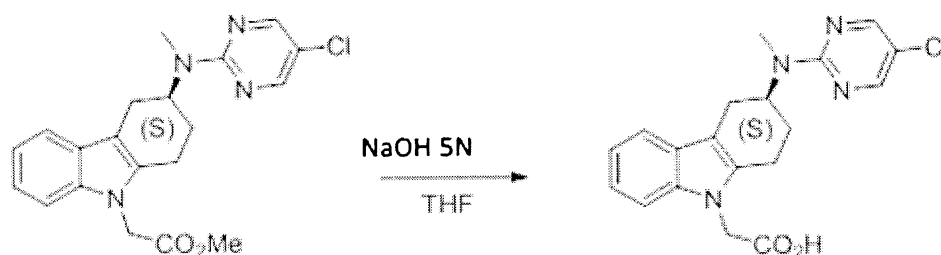
(S)-metyl 2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)axetat

(22 mg, 21%): HPLC (HPLC bất đối-1): t_R : 7,21 phút; và

(R)-metyl 2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)axetat

(21 mg, 20%): HPLC (HPLC bất đối-1): t_R : 9,06 phút.

A.6.2 Tổng hợp axit (S)-2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-3,4-đihydro-1H-carbazol-9(2H)-yl)axetic (ví dụ tham chiếu 1)



Bổ sung 5N NaOH (10 đương lượng) vào dung dịch chứa (S)-metyl 2-(3-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-yl)axetat (22 mg) trong THF (1 ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở RT trong 2h, axit hóa bằng HCl đậm đặc và khuấy ở RT. Lọc kết tủa tạo thành và làm khô để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng.

LC-MS: t_R : 0,93 phút/ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371,13.

HPLC (HPLC bất đối-2): t_R : 4,59 phút.

Thử nghiệm sinh học:

Chuẩn bị màng thụ thể hCRTH2 và thử nghiệm thay thế phối tử phóng xạ:

Trước tiên, tế bào HEK293-hCRTH₂ tái tổ hợp được tách ra từ đĩa nuôi cấy vào 5 ml dung dịch đệm A/đĩa (Dung dịch đệm A: 5 mM Tris, 1 mM MgCl₂-6H₂O pH=7,4) bằng cách sử dụng nạo cao su. Tiếp theo, các tế bào được chuyển vào ống ly tâm và được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 400 g. Viên kết tế bào được tái tạo huyền phù trong cùng dung dịch đệm và ống nghiệm được làm lạnh ở -80°C. Các tế bào được làm tan giá và các mảnh vụn màng được tạo ra bằng cách đồng hóa có sử dụng thiết bị đồng hóa polytron (30 giây). Tiếp theo, các mảnh vụn màng tế bào được ly tâm ở tốc độ 3000 g trong 20 phút và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm C (Dung dịch đệm C: 75 mM Tris, 25 mM MgCl₂, 250 mM Sacarosa pH 7,4). Các phần phân ước của mảnh vụn màng tế bào được bảo quản ở -20°C.

Thử nghiệm gắn kết được thực hiện trong thể tích thử nghiệm cuối là 250 µl. Trước tiên, 25 µl hợp chất thử nghiệm, đã được pha loãng trước trong dung dịch đệm gắn kết (dung dịch đệm gắn kết: 50 mM Tris-Base, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% BSA (không chứa proteaza), 0,01 % NaN₃, 10mM MnCl₂ độ pH 7,0) được đưa vào mỗi lỗ. Sau khi bổ sung 75 µl dung dịch đệm gắn kết, 50 µl phối tử phóng xạ ³H-PGD₂ (ở 2,5 nM (220,000 dpm/lỗ) từ ANAWA ART0662) được bổ sung vào mỗi lỗ. Thử nghiệm gắn kết được bắt đầu bằng cách bổ sung 100 µl mảnh vụn màng CRTH₂, đạt đến nồng độ cuối là 20µg/lỗ. Để gắn kết không đặc hiệu, PGD₂ được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng đến nồng độ cuối 10 mM. Hỗn hợp thử nghiệm này được ủ trong 90 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được lọc qua đĩa lọc 96 lỗ GF/C đã được thấm trước trong 3 giờ trong polyetylenimin (PEI) 0,5%. Các lỗ của đĩa lọc được rửa ba lần bằng dung dịch đệm gắn kết đã được làm lạnh trong nước đá. Tiếp theo, 40 µl Microscint-40 (Packard) được bổ sung vào mỗi lỗ và hoạt tính phóng xạ còn lại được định lượng trong thiết bị Topcount (Packard).

Hoạt tính đối kháng của hợp chất được nêu làm ví dụ được thể hiện trong bảng 4.

Ví dụ	Tên	IC ₅₀ [nM]
1	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	1,9
2	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	3,1
3	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	13
4	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	10
5	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	19
6	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	2,3
7	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	5,6
8	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	19

Thử nghiệm thay thế phổi tử phóng xạ - albumin huyết thanh người (Human Serum Albumin - HSA):

Thử nghiệm thay thế phổi tử phóng xạ với sự có mặt của albumin huyết thanh người (HSA) được tiến hành như đã mô tả ở trên, với những cải biến sau. Dung dịch đệm gắn kết-HSA: Dung dịch đệm gắn kết + 0,5% albumin từ huyết thanh người A1887 của Sigma (thay cho 0,1% BSA). Thử nghiệm gồm 25 µl hợp chất thử nghiệm, đã được pha loãng trước trong dung dịch đệm gắn kết-HSA được đưa vào mỗi lỗ. Sau khi bổ sung 75 µl dung dịch đệm gắn kết-HSA, 50 µl ³H-PGD₂ (ở 2,5 nM (220,000 dpm/lỗ) từ ANAWA ART0662) được bổ sung vào mỗi lỗ. Quy trình còn lại là giống như đã mô tả ở trên.

Hoạt tính đối kháng của hợp chất được nêu làm ví dụ được thể hiện trong bảng 5.

Ví dụ	Tên	IC ₅₀ [nM]
1	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	3,9
2	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	2,3
3	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	13
4	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	16
5	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	22
6	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	2,1
7	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	5,0
8	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	22

Thử nghiệm thay đổi hình dạng tế bào ưa eosin với huyết tương người

Sau khi có được sự đồng ý cho phẫu thuật, các mẫu máu được lấy qua đường tĩnh mạch theo quy trình được phê chuẩn bởi ủy ban đạo đức của Basel, Switzerland. Bạch cầu nhân đa hình (bao gồm tế bào ưa eosin, tế bào ưa bazơ và tế bào trung tính) được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp Polymorphprep™ (Axis-Shield). Tóm lại, máu nguyên vẹn đã được xử lý chống đông được sắp thành từng lớp lên trên gradient Polymorphprep (tỷ trọng 1,113 g/ml) và được ly tâm ở tốc độ 500 g trong 30

phút. Phân đoạn chứa tế bào nhân đa hình được thu nhận và được làm tan hồng cầu bằng cách phân giải nhờ dung dịch muối nhược trương.

Các tế bào nhân đa hình được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm thử nghiệm (1x PBS với $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ được bổ sung 0,1 % BSA, 10 mM HEPES, và 10 mM Glucoza, pH 7,4) ở 5×10^6 tế bào/ml và được nhuộm bằng kháng CD49d-APC ((APC=Allophycocyanin) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hợp chất thử nghiệm, ở các nồng độ khác nhau, được ủ sơ bộ 10 phút trong huyết tương người (được chống đông tụ bằng chất ức chế thrombin). Tiếp theo, huyết tương người được bổ sung vào các tế bào nhân đa hình đến 50% thể tích thử nghiệm cuối với tế bào nhân đa hình ở mật độ 4×10^6 tế bào/ml. Sau khi ủ trong 10 phút ở 37°C , các tế bào nhân đa hình được hoạt hóa trong 5 phút ở 37°C bằng cách bổ sung PGD_2 ở nồng độ cuối 100 nM. Dừng hoạt hóa bằng cách bổ sung 0,5 ml paraformaldehyt (1%).

Ngay sau khi cố định bằng paraformaldehyt, mẫu được phân tích bằng thiết bị đếm tế bào trong dòng chảy FACSCanto (BD Biosciences) và các tế bào đích được nhận biết nhờ đặc tính tán xạ trước (forward-scatter - FSC) và tán xạ bên (side-scatter - SSC). Tế bào ưa eosin được nhận dạng bằng tín hiệu kháng CD49d-APC và profile tán xạ bên đặc trưng (SSC) của chúng. Đáp ứng thay đổi hình dạng, biểu thị sự hoạt hóa tế bào ưa eosin, được định lượng dưới dạng tỷ lệ phần trăm số tế bào với sự tán xạ trước gia tăng.

Hoạt tính đối kháng của hợp chất được nêu làm ví dụ được thể hiện trong bảng 6.

Ví dụ	Tên	IC_{50} [nM]
1	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	71
2	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	4,2
3	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	148

4	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	417
5	axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	88
6	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	5,8
7	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	3,1
8	axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic	32

Thử nghiệm huy động canxi nội bào “Intracellular calcium mobilization assay - FLIPR):

Tế bào (HEK-293), biểu hiện ổn định thụ thể hCRTH2 dưới sự điều khiển của gen khởi đầu cytomegalovirus từ sự cài xen đơn lẻ của vector biểu hiện pcDNA5 (Invitrogen), được phát triển để nhập dòng trong môi trường DMEM (glucoza thấp, Gibco) được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (Bioconcept, Switzerland) trong điều kiện nuôi cấy thể bào động vật có vú tiêu chuẩn (37°C trong không khí đã được làm ẩm chứa 5% CO₂). Các tế bào được tách từ đĩa nuôi cấy bằng cách sử dụng dung dịch đệm phân tách (0,02% EDTA trong PBS, Gibco) trong 1 phút, và được thu hồi bằng cách ly tâm ở tốc độ 200 g ở nhiệt độ phòng trong 5 phút trong dung dịch đệm thử nghiệm (phần BSS Hank tương đương (HBSS, Bioconcept) và DMEM (glucoza thấp, không chứa đỏ phenol, Gibco)). Sau khi ủ trong 45 phút (37°C và 5% CO₂) với sự có mặt của 1 µM Fluo-4 và 0,04% Pluronic F-127 (cả hai đều do Molecular Probes cung cấp), và 20 mM HEPES (Gibco) trong dung dịch đệm thử nghiệm, tế bào được rửa bằng và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm thử nghiệm, tiếp theo được cấy lên đĩa thử nghiệm FLIPR 384 lỗ (Greiner) ở mật độ 50.000 tế bào trong 66 µl mỗi lỗ, và được làm lắng bằng cách ly tâm.

Dung dịch gốc chứa hợp chất thử nghiệm được chuẩn bị ở nồng độ 10 mM trong DMSO, và được pha loãng theo dãy nồng độ trong dung dịch đệm thử nghiệm đến nồng độ cần thiết đối với đường cong đáp ứng liều ức chế. Prostaglandin D₂ (Biomol, Plymouth Meeting, PA) được dùng làm chất chủ vận.

Dụng cụ FLIPR Tetra (Molecular Devices) được vận hành theo hướng dẫn tiêu chuẩn của nhà sản xuất, bằng cách bổ sung 4 µl hợp chất thử nghiệm đã được hoà tan ở nồng độ 10 mM trong DMSO và được pha loãng trước khi thí nghiệm trong dung dịch đệm thử nghiệm để đạt được nồng độ cuối mong muốn. 10 µl prostaglandin D₂ 80 nM (Biomol, Plymouth Meeting, PA) trong dung dịch đệm thử nghiệm, được bổ sung 0,8% albumin huyết thanh bò (hàm lượng axit béo <0,02%, Sigma), tiếp theo được bổ sung vào để thu được nồng độ cuối là 10 nM và 0,1%, tương ứng. Sự thay đổi mức phát huỳnh quang được giám sát trước và sau khi bổ sung hợp chất thử nghiệm ở $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm và $\lambda_{\text{em}}=540$ nm. Các giá trị pic phát xạ ở trên mức đường nền sau khi bổ sung prostaglandin D₂ được xuất ra sau khi trừ đi giá trị đường nền. Các giá trị được chuẩn hóa theo mẫu đối chứng ở mức cao (không bổ sung hợp chất thử nghiệm) sau khi trừ đi giá trị đường nền (không bổ sung prostaglandin D₂). Chương trình XLfit 3.0 (IDBS) được sử dụng để khớp dữ liệu vào đường cong đáp ứng liều vị trí đơn lẻ có phương trình $(A+((B-A)/(1+((C/x)^D))))$ và tính toán các giá trị IC₅₀.

Tính độc tế bào in vitro ở tế bào gan chuột cống được nuôi cấy sơ cấp

1. Các phương pháp

1.1. Phân lập và nuôi cấy tế bào gan chuột cống

Chuột cống Wistar đực trưởng thành được gây mê bằng natri pentobarbital và tế bào gan được phân lập theo quy trình tiêu chuẩn, chẳng hạn bằng cách truyền dung dịch collagenaza tại chỗ cho gan. Khả năng sống sót của tế bào gan đã tinh chế, được kiểm tra bằng phương pháp loại trừ thuốc nhuộm xanh trypan là lớn hơn 85%. Tế bào gan đã phân lập được tái tạo huyền phù trong Williams Medium E tiêu chuẩn, không chứa đỏ phenol, được bổ sung (WME supp.) transferrin (100 µg/ml), triiodothyronin (10 µg/ml), gentamixin (50 µg/ml), hydrocortison hemisuccinat

(13,36 µg/ml), glucagon (5 µg/ml), HEPES (10 mM), inosin (10 µg/ml), insulin (10 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml) và penicillin (100 U/ml) và 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum - FBS). Tế bào được cấy vào các đĩa 24 lỗ được phủ collagen ở mật độ ban đầu là 2×10^5 tế bào/lỗ. Sau 4 giờ gắn vào đĩa nuôi cấy, môi trường được hút ra và thay bằng môi trường bổ sung WME mới không chứa FBS có chứa hợp chất thử nghiệm và được ủ trong 24 giờ ở 37°C trong môi trường không khí chứa 95% O₂ và 5% CO₂. Đối với mỗi thí nghiệm, nghĩa là, với mỗi mẻ tế bào gan, thực hiện xử lý bốn mẫu lặp bằng hợp chất thử nghiệm. Bốn mẫu đối chứng lặp (chỉ xử lý bằng tá dược lỏng) cũng có mặt trên mỗi đĩa nuôi cấy.

1.2 Sự tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm *in vitro*

Dung dịch gốc chứa hợp chất thử nghiệm được điều chế trong DMSO vài giờ trước khi bắt đầu xử lý. Dịch pha loãng thích hợp của dung dịch gốc này được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ngay trước khi xử lý để có được nồng độ cuối là 0, 3, 10, 30, 100 và 300 µM. Nồng độ cuối của tá dược lỏng DMSO là 1% (v/v).

1.3 Khả năng sống sót của giống cấy tế bào

1.3.1 Kiểm tra hình thái học của lớp đơn

Hình thái học của các lớp đơn tế bào gan được kiểm tra bằng kính hiển vi quang học sau 24 giờ tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm. Tác dụng liên quan đến việc xử lý được mô tả theo các cấp độ sau đây:

0 Không quan sát thấy sự thay đổi về hình thái học nhờ việc xử lý so với dịch nuôi cấy đối chứng

1-3 Việc xử lý gây ra sự thay đổi bất kỳ về mặt hình thái học, chẳng hạn sự kết hạt nội bào, sự tạo không bào hoặc sự chết tế bào. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng, những thay đổi này được đề cập đến như là thay đổi không đáng kể (1), thay đổi vừa phải (2) hoặc thay đổi rõ rệt (3).

K Việc xử lý gây ra 100% tế bào chết và/hoặc sự tách rời hoàn toàn của lớp đơn khiến cho đĩa hoàn toàn không còn chứa tế bào.

1.3.2 Sự thất thoát lactat dehydrogenaza

Sau 24 giờ xử lý dịch nuôi cấy tế bào gan, các phần phân ước của môi trường nuôi cấy được thu nhận cẩn thận và được sử dụng để phân tích hoạt tính lactat dehydrogenaza (LDH) bằng phương pháp đo quang phổ có sử dụng kit phát hiện tính độc tế bào LDH do Clontech cung cấp (cat No. 630117, Mountain View, CA, USA). Đối với mỗi thí nghiệm, dịch nuôi cấy bổ sung được sử dụng để xác định tổng hoạt tính LDH nội bào ở thời điểm bắt đầu xử lý. Nhằm mục đích này, 4 lỗ chứa dịch nuôi cấy tế bào trong mỗi thí nghiệm được rửa bằng dung dịch nước muối lạnh trước khi bắt đầu xử lý, được xử lý siêu âm trong môi trường sạch và dịch đồng nhất được phân tích tổng hoạt tính LDH. Hoạt tính enzym trong môi trường nuôi cấy được đánh giá và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm tổng hoạt tính có mặt trong tế bào gan nuôi cấy ở thời điểm bắt đầu xử lý.

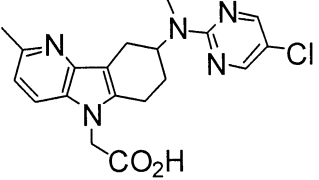
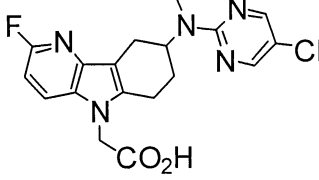
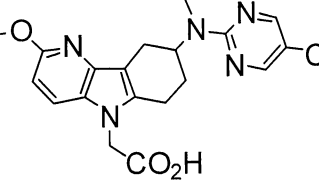
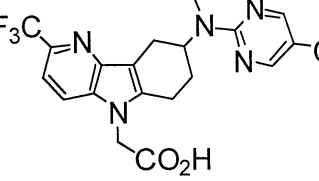
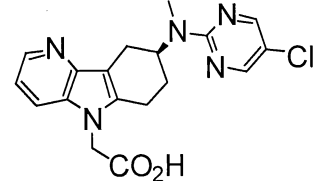
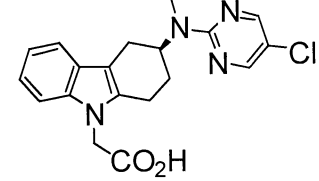
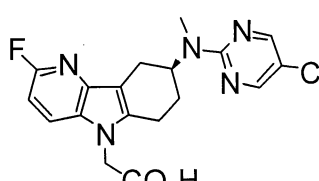
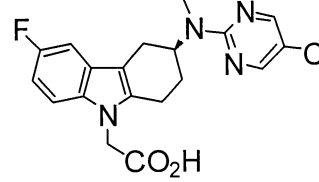
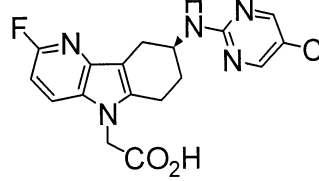
2. Phân tích dữ liệu

Nồng độ gây độc tế bào thấp nhất (lowest cytotoxic concentration - LCC) và nồng độ không ảnh hưởng (no effect concentration - NoEC) được đưa ra đối với mỗi hợp chất, dựa trên hình thái học tế bào và mức thất thoát LDH sau 24 giờ xử lý. LCC được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của hợp chất thử nghiệm dẫn đến ảnh hưởng rõ rệt đến tế bào gan chuột nhất đã được nuôi cấy (cấp độ hình thái học ≥ 2 hoặc mức thất thoát LDH tăng ≥ 2 lần). Giá trị LCC $> 300 \mu\text{M}$ cho thấy không có sự ảnh hưởng đối với cả hai điểm cuối ở nồng độ thử nghiệm cao nhất là $300 \mu\text{M}$. Hợp chất mà chỉ thể hiện tính độc tế bào không đáng kể (cấp độ thay đổi hình thái học là 1 hoặc mức thất thoát LDH tăng < 2 lần) ở nồng độ thử nghiệm cao nhất được đánh dấu là “300s”. NoEC được định nghĩa là nồng độ thử nghiệm cao nhất của hợp chất này mà nó không gây ảnh hưởng đến tế bào gan chuột nhất đã được nuôi cấy (hình thái học và mức thất thoát LDH).

3. Kết quả

Bảng 7. Giá trị LCC của các hợp chất được nêu làm ví dụ

Ví dụ	LCC [μM]	NoEC [μM]	Ví dụ	LC C	NoEC [μM]
-------	--------------------------	---------------------------	-------	---------	---------------------------

				[μ M]	
 ví dụ 1	>300	>300	 ví dụ 2	>300	>300
 ví dụ 3	300s	100	 ví dụ 4	300s	100
 ví dụ 6	>300	>300	 ví dụ tham chiếu 1 (<i>(S)</i>-chất đồng phân đối ảnh của hợp chất ví dụ 53 từ WO 2011/117798)	300	30
 ví dụ 7	>300	>300	 ví dụ tham chiếu 2 (ví dụ 9 từ WO 2011/117798)	300	30
 ví dụ 8	>300	>300			

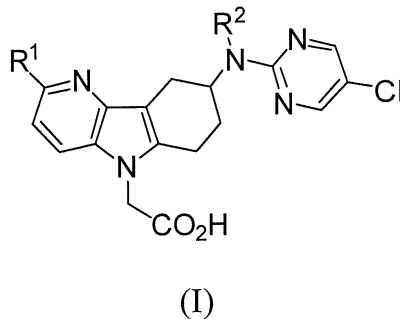
Tính độc in-vivo ở gan:

Tính độc ở gan của hợp chất có công thức (I) có thể được phân tích bằng cách cho chuột cống và các loài không gặm nhấm dùng hợp chất này ở các liều dùng khác nhau qua đường miệng trong thời gian lên tới 4 tuần. Tính khuận nghịch của tính độc có thể có thể được kiểm tra trong giai đoạn không xử lý sau đó (giai đoạn phục hồi). Mức liều lượng được lựa chọn tùy theo khoảng liều lượng được nêu trong nghiên cứu ở các loài tương ứng. Liều lượng cao được mong đợi để nhận biết tính độc cơ quan xảy ra ở liều được dung nạp tối đa. Liều lượng trung bình và thấp được lựa chọn dựa trên mức tiếp xúc ước tính khi điều trị cho người. Mức tiếp xúc của hợp chất này được xác định ở mỗi mức liều lượng.

Ở cuối quá trình xử lý và ở cuối quá trình thu hồi, các chỉ thị sinh học ở gan (ví dụ như các enzym, protein, triglyxerit hoặc cholesterol ở gan) được xác định trong máu. Ngoài ra, các lát cắt ở gan đã được nhuộm Hematoxinilin-Eosin được kiểm tra dưới kính hiển vi để đánh giá trực tiếp các tổn thương có thể ở mức cơ quan. Việc nhuộm đặc hiệu các lát cắt gan có thể được đòi hỏi để mô tả kỹ hơn các phát hiện có thể có ở gan.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức (I):



trong đó:

R^1 là hydro, (C_{1-4}) alkyl, (C_{1-2}) floalkyl, (C_{1-4}) alkoxy, hoặc halogen; và

R^2 là hydro hoặc metyl;

hoặc muối của hợp chất này.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 là hydro, metyl, triflometyl, metoxy, hoặc flo;

hoặc muối của hợp chất này.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 là hydro, (C_{1-4}) alkyl, hoặc (C_{1-4}) alkoxy;

hoặc muối của hợp chất này.

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 là hydro, metyl, hoặc metoxy;

hoặc muối của hợp chất này.

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 là flo;

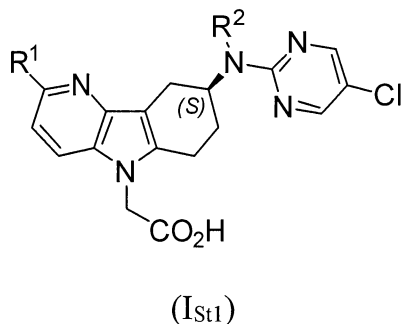
hoặc muối của hợp chất này.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó:

R^2 là metyl;

hoặc muối của hợp chất này.

7. Hợp chất có công thức (I) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó cấu hình tuyệt đối của tâm lập thể là như được mô tả trong công thức (I_{St1}):



hoặc muối của hợp chất này.

8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic; và

axit 2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

hoặc muối của hợp chất này.

9. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

axit (*S*)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic; và

axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-(triflometyl)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic;

hoặc muối của hợp chất này.

10. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)(metyl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic hoặc muối của nó.

11. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là axit (S)-2-(8-((5-clopyrimidin-2-yl)amino)-2-flo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrido[3,2-b]indol-5-yl)axetic hoặc muối của nó.

12. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang dược dụng.