



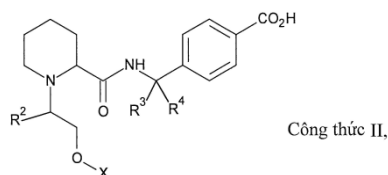
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07D 211/60; A61P 29/00; A61K 31/45; A61P 19/00 (13) B



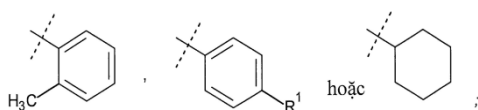
1-0023791

(21) 1-2014-04106 (22) 20/06/2013
(86) PCT/US2013/046684 20/06/2013 (87) WO2014/004229 03/01/2014
(30) 61/665,951 29/06/2012 US; 61/779,099 13/03/2013 US
(45) 25/05/2020 386 (43) 25/05/2015 326A
(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) SCHIFFLER, Matthew Allen (US); YORK, Jeremy Schulenburg (US)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT PHENOXYETYL PIPERIDIN, MUỐI HYĐROCLORUA CỦA NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ
(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức II:



trong đó X là:



R¹ là H, -CN, hoặc F;

R² là H hoặc metyl;

R³ là H; và

R⁴ là H, metyl, hoặc etyl; hoặc

R³ và R⁴ kết hợp cùng với nhau tạo ra vòng xyclopropyl;

hoặc muối được dụng của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất phenoxyetyl piperidin, muối hydroclorua của nó và dược phẩm chứa nó. Các hợp chất này là hữu hiệu để điều trị các rối loạn sinh lý.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế thuộc lĩnh vực điều trị các tình trạng bệnh viêm, như bệnh viêm khớp, bao gồm bệnh viêm khớp xương mạn tính và bệnh viêm khớp dạng thấp, và còn bao gồm chứng đau kết hợp với các tình trạng bệnh này. Riêng ở Mỹ, bệnh viêm khớp làm ảnh hưởng đến hàng triệu đối tượng mắc bệnh và là nguyên nhân chính gây ra tàn tật. Việc điều trị thường bao gồm NSAID (dược chất chống viêm không steroid) hoặc các chất ức chế COX-2 mà có thể tạo ra các tác dụng phụ không hay đối với tim mạch và/hoặc dạ dày-ruột. Do đó, những đối tượng mắc bệnh mà có profin tim mạch tồi, như mắc bệnh cao huyết áp, không thể sử dụng NSAID hoặc chất ức chế COX-2. Do đó, vẫn có nhu cầu đối với các phương pháp khác để điều trị bệnh viêm khớp xương mạn tính và bệnh viêm khớp dạng thấp, tốt hơn là không kèm theo các tác dụng phụ của các phương pháp điều trị hiện tại.

Bốn kiểu thụ thể prostaglandin E₂ (PGE₂) đã được nhận dạng như sau: EP1, EP2, EP3, và EP4. Đã bộc lộ rằng EP4 là thụ thể quan trọng nhất có liên quan đến chứng đau do viêm khớp trong các mô hình động vật gặm nhấm mắc bệnh viêm khớp dạng thấp và bệnh viêm khớp xương mạn tính (Xem, ví dụ ấn phẩm: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325, 425 (2008)). Do đó, chất đối kháng EP4 chọn lọc có thể là hữu ích trong việc điều trị bệnh viêm khớp, bao gồm chứng đau do viêm khớp. Ngoài ra, đã gợi ý rằng do việc đối kháng EP4 không cản trở quá trình sinh tổng hợp prostanoit, như PGI₂ và TxA₂, chất đối kháng EP4 chọn lọc có thể không có tác dụng phụ tiềm năng đối với tim mạch mà được thấy với NSAID và chất ức chế COX-2. (Xem *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 484 (2011) chẳng hạn).

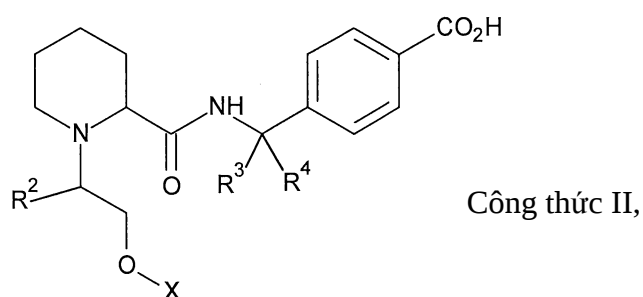
WO 2013/004290 bộc lộ dẫn xuất amin mạch vòng dùng làm chất đối kháng thụ thể EP4. US 2005/0250818 bộc lộ một số hợp chất aryl và heteroaryl amit được thế

ở vị trí ortho là các chất đối kháng chọn lọc thụ thể EP4 có hoạt tính giảm đau. Ngoài ra, WO 2011/102149 bộc lộ một số hợp chất là các chất đối kháng EP4 chọn lọc mà hữu ích trong việc điều trị các bệnh do IL-23 gây ra.

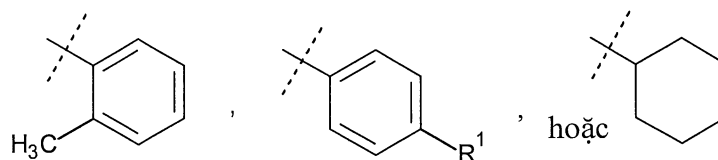
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các hợp chất là các chất ức chế chọn lọc EP4 so với EP1, EP2, và EP3. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các hợp chất có khả năng gây ra các tác dụng phụ đối với tim mạch hoặc dạ dày-ruột giảm so với các NSAID truyền thống.

Do đó, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức II:



trong đó X là:



R^1 là H, -CN, hoặc F;

R^2 là H hoặc metyl;

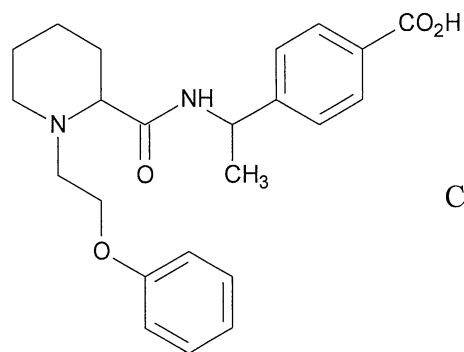
R^3 là H; và

R^4 là H, metyl, hoặc etyl; hoặc

R^3 và R^4 kết hợp cùng với nhau tạo ra vòng xyclopropyl;

hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức I:



Công thức I

hoặc muối được dụng của nó.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh viêm khớp ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng hợp chất có công thức I hoặc công thức II hoặc muối được dụng của nó với lượng hữu hiệu. Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh viêm khớp xương mạn tính ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó với lượng hữu hiệu. Ngoài ra, bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó với lượng hữu hiệu của. Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị chứng đau kết hợp với bệnh viêm khớp ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó với lượng hữu hiệu. Bản mô tả còn bộc lộ phương pháp điều trị chứng đau kết hợp với bệnh viêm khớp xương mạn tính hoặc bệnh viêm khớp dạng thấp ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó với lượng hữu hiệu.

Hơn nữa, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị, cụ thể là để điều trị bệnh viêm khớp xương mạn tính. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Sáng chế cũng đề xuất hợp chất hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong

điều trị chứng đau kết hợp với bệnh viêm khớp xương mạn tính hoặc bệnh viêm khớp dạng thấp. Hơn nữa, bản mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc điều trị bệnh viêm khớp xương mạn tính. Bản mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Bản mô tả cũng bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc điều trị chứng đau kết hợp với bệnh viêm khớp xương mạn tính hoặc bệnh viêm khớp dạng thấp.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Theo phương án cụ thể, được phẩm còn chứa một hoặc nhiều chất điều trị khác. Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất trung gian mới và các quy trình để điều chế hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị các tình trạng bệnh viêm như bệnh viêm khớp, bao gồm bệnh viêm khớp xương mạn tính và bệnh viêm khớp dạng thấp, ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng chất đối kháng của prostaglandin tiền viêm, như chất đối kháng EP4 với lượng hữu hiệu, kết hợp với chất điều biến thụ thể lipoxin hoặc resolvin, như chất điều biến BLT-1, BLT-2, ALX/FPR1, GPR32, CysLT1, CysLT2, hoặc ChemR23 với lượng hữu hiệu.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị bệnh viêm như bệnh viêm khớp, bao gồm bệnh viêm khớp xương mạn tính và bệnh viêm khớp dạng thấp, ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh cần điều trị dùng chất ức chế prostaglandin synthaza tiền viêm, như chất ức chế mPGES-1 với lượng hữu hiệu, kết hợp với chất điều biến thụ thể lipoxin hoặc resolvin, như chất điều biến BLT-1, BLT-2, ALX/FPR1, GPR32, CysLT1, CysLT2, hoặc ChemR23 với lượng hữu hiệu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “việc điều trị” hoặc “điều trị” bao gồm việc ngăn chặn, cản trở, làm chậm, làm ngừng hoặc làm đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ trầm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn hiện có.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng mắc bệnh” là đề chỉ động vật có vú, như chuột nhắt, chuột lang, chuột cống, chó hoặc người. Cần phải hiểu rằng đối tượng mắc bệnh được ưu tiên là người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” là đề chỉ lượng hoặc liều của hợp chất của sáng chế hoặc muối được dụng của nó mà, khi dùng dưới dạng liều đơn hoặc đa liều cho đối tượng mắc bệnh, tạo ra tác dụng mong muốn ở đối tượng mắc bệnh tham gia chẩn đoán hoặc điều trị.

Lượng hữu hiệu có thể được xác định một cách dễ dàng bởi bác sỹ điều trị, như chuyên gia trong lĩnh vực này, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến và bằng cách quan sát các kết quả thu được trong các điều kiện tương tự. Trong khi xác định lượng hữu hiệu đối với đối tượng mắc bệnh, nhiều yếu tố được xét đến bởi bác sỹ điều trị, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: loài động vật có vú; kích cỡ của nó, tuổi và tình trạng sức khỏe nói chung; bệnh hoặc rối loạn cụ thể bị mắc phải; mức độ của hoặc sự liên quan hoặc mức độ trầm trọng của bệnh hoặc rối loạn; sự đáp ứng của mỗi đối tượng mắc bệnh; hợp chất cụ thể được dùng; phương thức dùng; đặc điểm độ sinh khả dụng của dược phẩm được dùng; chế độ liều được chọn; việc sử dụng dược phẩm đồng thời; và các điều kiện liên quan khác.

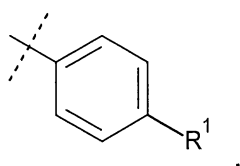
Các hợp chất có công thức I hoặc công thức II, hoặc muối được dụng của nó, thường là hữu hiệu trong khoảng liều rộng. Ví dụ, các liều/ngày thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50mg/kg thể trọng. Trong một số trường hợp, các mức liều lượng nhỏ hơn giới hạn dưới của khoảng đã nêu có thể là thích hợp hơn, trong khi trong các trường hợp khác các liều lớn hơn nữa có thể được dùng với các tác dụng phụ chấp nhận được và do đó khoảng liều lớn hơn là không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Tốt hơn là, các hợp chất của sáng chế được bào chế ở dạng dược phẩm được

dùng theo đường bất kỳ mà khiến cho hợp chất là sinh khả dụng. Tốt nhất là, các dược phẩm này để dùng qua đường miệng. Các dược phẩm và quy trình bào chế chúng đã được biết đến trong lĩnh vực này. (Xem Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006 chẳng hạn).

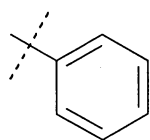
Các hợp chất có công thức I và công thức II là đặc biệt hữu ích trong các phương pháp điều trị theo sáng chế, nhưng một số nhóm, phần tử thể và cấu hình là được ưu tiên đối với các hợp chất có công thức I và II. Phần mô tả sau đây mô tả các nhóm, phần tử thể và cấu hình được ưu tiên này. Cần phải hiểu rằng sự ưu tiên này có thể áp dụng cho các phương pháp điều trị và cho các hợp chất mới của sáng chế.

Tốt hơn là R^1 là H, R^2 là H, R^3 là H, và X là:

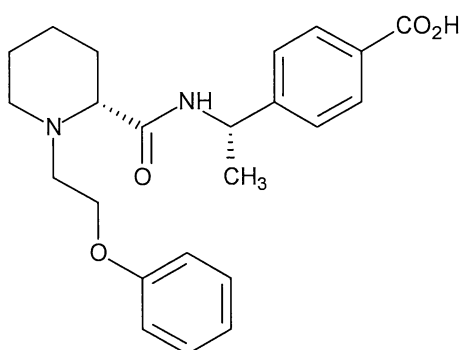


Tốt hơn nữa là khi R^3 là H, thì R^4 là methyl.

Tốt hơn nữa là X là



Axit 4-[(1*S*)-1-[[*(2R)*-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-carbonyl]amino]etyl]benzoic có công thức sau đây:



và muối được dụng của nó là được đặc biệt ưu tiên.

Hydroclorua của axit 4-[(1*S*)-1-[[*(2R)*-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-carbonyl]amino]etyl]benzoic là được đặc biệt ưu tiên hơn nữa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kPag” là để chỉ kilopascal gauge; “Boc” là để chỉ nhóm bảo vệ *tert*-butoxy carbonyl; “DMEM” là để chỉ Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium; “ACN” là để chỉ axetonitril; “DMSO” là để chỉ dimethylsulfoxit; “DMF” là để chỉ *N,N*-dimethylformamit; “EtOH” là để chỉ etanol; “THF” là để chỉ tetrahydrofuran; “MeOH” là để chỉ metanol; “EtOAc” là để chỉ etyl axetat; “Et₂O” là để chỉ dietyl ete; “TBME” là để chỉ *tert*-butyl metyl ete; “BOP” là để chỉ benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphon hexaflophosphat; “NaHMDS” là để chỉ natri bis(trimetylsilyl)amit; “PGE₂” là để chỉ prostaglandin E₂; “FBS” là để chỉ huyết thanh bào thai bò; “IBMX” là để chỉ (3-isobutyl-1-metylxantin); “MES” là để chỉ axit (2-(*N*-morpholino)etansulfonic; “HEPES” là để chỉ (axit 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic); “HTRF” là để chỉ kỹ thuật huỳnh quang được phân giải theo thời gian đồng nhất; “HEK” là để chỉ thận của phôi người; “HBSS” là để chỉ dung dịch nước muối được cân bằng Hank; “EC₈₀” là để chỉ nồng độ của chất mà tạo ra 80% hiệu quả tối đa có thể có đối với chất; và “IC₅₀” là để chỉ nồng độ của chất mà tạo ra 50% sự đáp ứng ức chế tối đa có thể có đối với chất.

Muối được dụng và phương pháp luận chung để bào chế chúng là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem Gould, P.L., “Salt selection for basic drugs,” *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* “Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities,” *Organic Process Research and Development*, **4**: 427-435 (2000); và Berge, S.M., *et al.*, “Pharmaceutical Salts,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977) chẳng hạn. Chuyên gia trong lĩnh vực điều chế sẽ nhận thức rõ rằng các hợp chất có công thức I và công thức II được chuyển hoá một cách dễ dàng thành và có thể được tách ở dạng muối được dụng, như muối hydroclorua, bằng cách sử dụng các kỹ thuật và điều kiện mà chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực điều chế sẽ nhận thức rõ rằng các hợp chất có công thức I và công thức II được

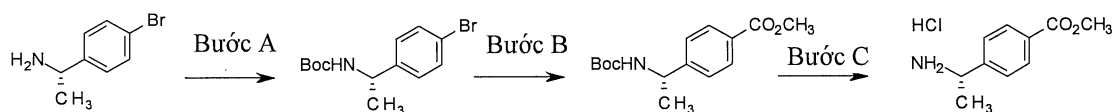
chuyển hoá một cách dễ dàng thành và có thể được tách ở dạng axit tự do hoặc bazơ tự do từ muối được dụng tương ứng.

Sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang, cũng như hỗn hợp gồm các chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang của các hợp chất bao gồm raxemat. Các chất đồng phân, chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang riêng rẽ có thể được tách hoặc được phân giải bởi chuyên gia trong lĩnh vực này ở điểm thuận lợi bất kỳ trong quy trình điều chế hợp chất của sáng chế bằng các phương pháp như các kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký không đối xứng (xem ví dụ ấn phẩm: J. Jacques, et al., "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, Inc., 1981, và E.L. Eliel và S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994).

Hợp chất của sáng chế hoặc muối được dụng của nó có thể được điều chế bằng nhiều quy trình đã được biết đến trong lĩnh vực này, một số trong số chúng được minh hoạ trong các sơ đồ, phần điều chế và các ví dụ dưới đây. Các bước điều chế cụ thể đối với mỗi trong số các con đường được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau hoặc kết hợp với các bước từ các sơ đồ khác nhau, để tạo ra hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Các sản phẩm của mỗi bước trong sơ đồ dưới đây có thể được thu gom bằng các phương pháp thông thường, bao gồm chiết, bay hơi, kết tinh, sắc ký, lọc và kết tủa. Các thuốc thử và nguyên liệu khởi đầu là sẵn có đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Trừ khi có quy định khác, tất cả các phần tử thể là như được xác định trên đây. Cần phải hiểu rằng các sơ đồ, phương pháp điều chế và ví dụ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

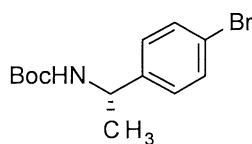
Ví dụ thực hiện sáng chế

Sơ đồ 1



Ví dụ điều chế 1

Điều chế (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-1-(4-bromophenyl)etylamin.



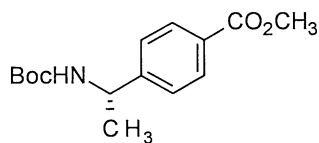
Sơ đồ 1, Bước A: Bổ sung di-*tert*-butylđicacbonat (1,09g, 5,0mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa (-)-1-(4-bromophenyl)etylamin (1,00g, 5,0mmol) trong điclorometan (10mL) ở 0°C. Để hỗn hợp phản ứng ấm đến nhiệt độ trong phòng, sau đó khuấy trong hai giờ. Bổ sung axit clohydric 1M (25mL) vào hỗn hợp đang khuấy, tiếp theo thêm Et₂O (25mL) vào. Tách các lớp và chiết lớp nước bằng Et₂O (2 × 25mL). Gom các lớp hữu cơ, rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hoà (25mL), làm khô lớp hữu cơ bằng MgSO₄, lọc để loại bỏ chất rắn, và cô phần dịch lọc dưới áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (1,50g, hiệu suất 99%). Phổ khối (*m/z*) (⁷⁹Br/⁸¹Br) 244/246 (M + 2H - *t*-Bu)⁺, 322/324 (M + Na)⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,46–7,43 (m, 2H), 7,19–7,15 (m, 2H), 4,81–4,65 (m, 1H), 1,48–1,36 (m, 12H).

Điều chế hợp chất sau đây hầu như bằng phương pháp nêu trong ví dụ điều chế 1, bằng cách sử dụng 1-(4-bromophenyl)xyclopropanamin thay cho (-)-1-(4-bromophenyl)etylamin:

Điều chế số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (<i>m/z</i>)
2	<i>tert</i> -butyl bromophenyl) xyclopropyl]carbamate		(⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br) 256/258 (M + 2H - <i>t</i> -Bu) ⁺ , 334/336 (M + Na) ⁺

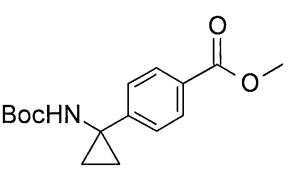
Ví dụ điều chế 3

Điều chế methyl (*S*)-4-(1-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)benzoat.



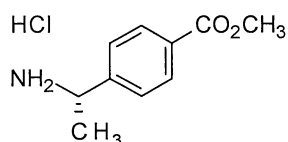
Sơ đồ 1, Bước B: Bổ sung $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (120mg, 0,53mmol), 1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen (355mg, 0,64mmol), (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-1-(4-bromophenyl)etylamin (1,50g, 5,0mmol), CH_3CN khan (45mL), CH_3OH khan (30mL), và trietylamin (1,9mL, 13,63mmol) vào nồi hấp Parr kèm khuấy cơ học. Đậy nắp bình và điều áp bằng cacbon monoxit đến 724kPag. Gia nhiệt bình chứa đến 85°C và khuấy hỗn hợp qua đêm. Làm thông hơi bình phản ứng (*Cảnh báo – khí độc!*) và chuyển vào bình thót cổ đáy tròn, tráng bằng CH_3OH . Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm để thu được phần cặn có màu cam. Thêm nước (50mL) vào, sau đó chiết bằng EtOAc ($2 \times 50\text{mL}$). Rửa pha hữu cơ gom lại bằng dung dịch nước NaCl bão hoà (25mL), sau đó tách các lớp, làm khô pha hữu cơ bằng MgSO_4 , lọc để loại bỏ chất rắn, và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký nhanh trên silicagel rửa giải bằng gradient từ 0% đến 60% EtOAc/hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (1,00g, hiệu suất 72%). Phổ khối (m/z) 224 ($\text{M} + 2\text{H} - t\text{-Bu}$)⁺, 302 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 581 ($2\text{M} + \text{Na}$)⁺. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,89 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,41 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 4,64 (dq, $J = 7,4, 6,8$ Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 1,34 (br s, 9H), 1,28 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H).

Điều chế hợp chất sau đây hầu như bằng phương pháp nêu trong ví dụ điều chế 3, sử dụng *tert*-butyl *N*-[1-(4-bromophenyl)xyclopropyl]carbamate thay cho (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-1-(4-bromophenyl)etylamin:

Điều chế số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (<i>m/z</i>)
4	metyl 4-[1-(<i>tert</i> -butoxycarbonylamino)xy-cyclopropyl]benzoat		236 (<i>M</i> + 2H – <i>t</i> -Bu) ⁺ , 314 (<i>M</i> + Na) ⁺ , 605 (2 <i>M</i> + Na) ⁺

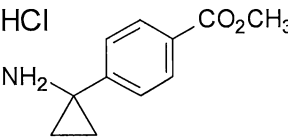
Ví dụ điều chế 5

Điều chế metyl (*S*)-4-(1-aminoethyl)benzoat hydroclorua.

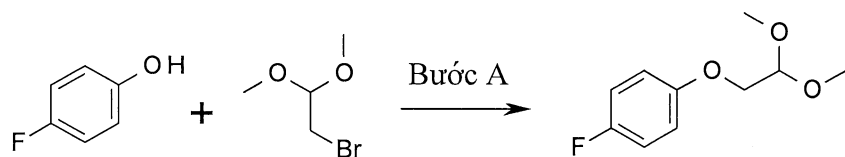


Sơ đồ 1, Bước C: Bổ sung hydroclorua (4M trong dioxan, 5mL, 20mmol) vào metyl (*S*)-4-(1-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)benzoat (1,00g, 3,58mmol) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (750mg, hiệu suất 97%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,57 (br s, 3H), 7,99 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,65 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,47 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 1,50 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

Điều chế hợp chất sau đây hầu như bằng phương pháp nêu trong ví dụ điều chế 5, sử dụng metyl 4-[1-(*tert*-butoxycarbonylamino)xy-cyclopropyl]benzoat thay cho metyl (*S*)-4-(1-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)benzoat:

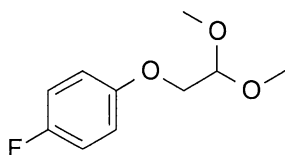
Điều chế số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (<i>m/z</i>)
6	metyl 4-(1-aminocyclopropyl)benzoat hydroclorua		192 (<i>M</i> + H) ⁺

Sơ đồ 2



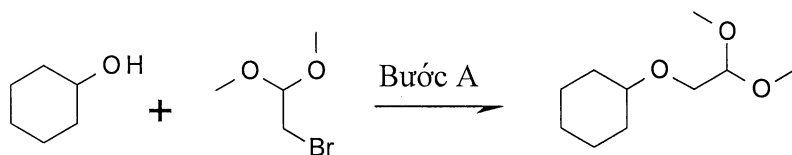
Ví dụ điều chế 7

Điều chế 1-(2,2-dimethoxyethoxy)-4-flobenzen.



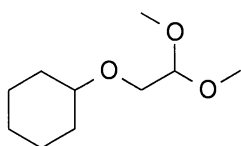
Sơ đồ 2, Bước A: Hoà tan 4-flophenol (5,5g, 49,1mmol) trong axetonitril (49mL) và xử lý dung dịch bằng 2-bromo-1,1-dimethoxyetan (11,6mL, 98,1mmol) và K_2CO_3 (16,95 g, 122,7mmol). Gia nhiệt dung dịch đến nhiệt độ hồi lưu kèm khuấy trong năm ngày. Lọc hỗn hợp và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Đưa nguyên liệu thô thu được đi sắc ký silicagel rửa giải bằng gradient từ 0% đến 50% EtOAc/hexan. Cô đặc các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu không màu (5,85g, hiệu suất 60%). Phổ khối (m/z) 218 ($M + NH_4^+$), 223 ($M + Na^+$).

Sơ đồ 3



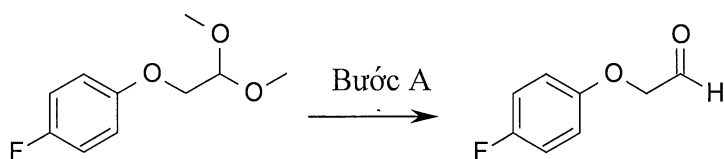
Ví dụ điều chế 8

Điều chế (2,2-dimethoxyethoxy)xyclohexan.



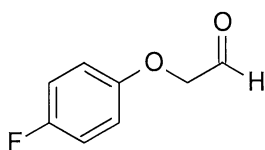
Sơ đồ 3, Bước A: Hoà tan cyclohexanol (2,00mL, 19,1mmol) trong DMF (9,6mL), sau đó thêm NaHMDS (dung dịch 1M trong THF, 21,0mL, 21,0mmol), và khuấy dung dịch ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Bổ sung 2-bromo-1,1-dimetoxyetan (2,26mL, 19,1mmol), sau đó khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong khí nitơ trong ba ngày. Pha loãng hỗn hợp bằng EtOAc (250mL) và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hoà ($2 \times 250\text{mL}$). Làm khô pha hữu cơ bằng MgSO_4 , lọc và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm. Đưa nguyên liệu thô thu được đi sắc ký silicagel rửa giải bằng gradient từ 0% đến 10% EtOAc/hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu màu vàng nhạt (1,10g, hiệu suất 31%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4,47 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 3,49 (d, $J = 5,3$ Hz, 2H), 3,39 (s, 6H), 3,25 (tt, $J = 9,2, 3,7$ Hz, 1H), 1,94–1,87 (m, 2H), 1,76–1,69 (m, 2H), 1,55–1,49 (m, 1H), 1,34–1,17 (m, 5H).

Sơ đồ 4



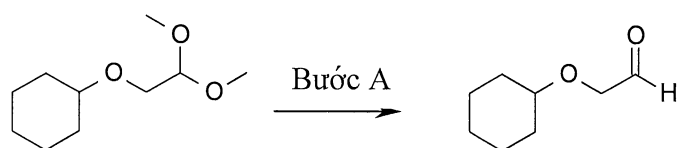
Ví dụ điều chế 9

Điều chế 2-(4-flophenoxy)axetalđehyt.



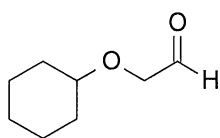
Sơ đồ 4, Bước A: Hoà tan 1-(2,2-dimetoxyetoxy)-4-flobenzen (1,00g, 4,99mmol) trong cloroform (5,0mL) và xử lý hỗn hợp bằng axit trifloaxetic (0,755mL, 9,99mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong hai ngày, sau đó gia nhiệt đến 65°C và khuấy trong 4 giờ. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu không màu với độ tinh khiết khoảng 70%, như được chỉ ra bởi phân tích ^1H NMR (550mg, hiệu suất chưa được hiệu chỉnh 71%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9,85 (t, $J = 0,5$ Hz, 1H), 7,00 (dd, $J = 8,9, 8,5$ Hz, 2H), 6,85 (dd, $J = 9,5, 4,3$ Hz, 2H), 4,55 (br s, 2H).

Sơ đồ 5



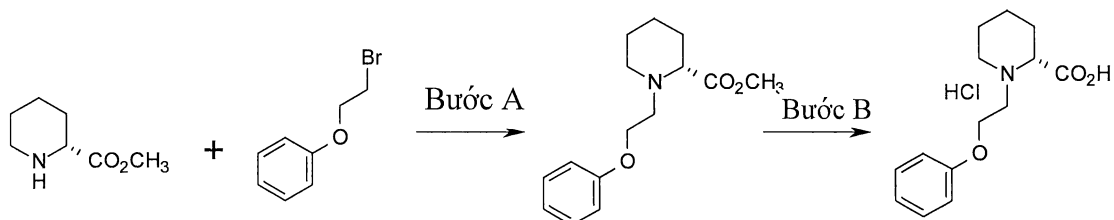
Ví dụ điều chế 10

Điều chế 2-(xyclohexyloxy)axetalđehyt.



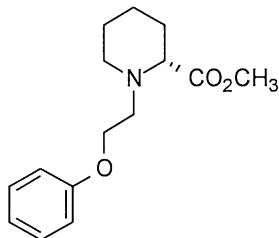
Sơ đồ 5, Bước A: Axit hoá hỗn hợp gồm (2,2-đimetoxyetoxy)xyclohexan và nước (30mL) đến độ pH = 1,0 bằng axit sulfuric (dung dịch nước 9,0M) và nổi hỗn hợp vào đầu chưng cất đường ngắn. Làm giảm áp suất đến 26,7kPa và gia nhiệt hỗn hợp đến 100°C trong 1 giờ. Làm nguội hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng, sau đó chiết lớp nước bằng TBME (2 × 75mL). Rửa các lớp hữu cơ gom lại bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hoà (75mL) và dung dịch nước NaCl bão hoà (75mL). Làm khô pha hữu cơ bằng MgSO₄, lọc và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (634mg, hiệu suất 51%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9,73 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H), 4,06 (d, *J* = 1,0 Hz, 2H), 3,31 (tt, *J* = 9,2, 3,9 Hz, 1H), 1,95–1,89 (m, 2H), 1,79–1,68 (m, 2H), 1,57–1,50 (m, 1H), 1,39–1,20 (m, 5H).

Sơ đồ 6



Ví dụ điều chế 11

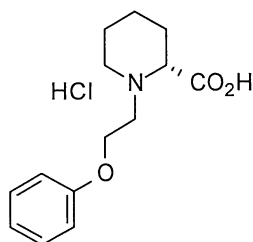
Điều chế methyl (*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-carboxylat.



Sơ đồ 6, Bước A: Hoà tan methyl (*R*)-piperidin-2-carboxylat (5,00g, 34,9mmol) trong DMF (87mL) và xử lý bằng K₂CO₃ (14,48g, 104,8mmol) và β-bromophenetol (7,16g, 34,9mmol). Khuấy hỗn hợp qua đêm ở 100°C. Làm nguội hỗn hợp đến nhiệt độ trong phòng và thêm EtOAc (250mL) vào. Rửa pha hữu cơ bằng nước (4 × 100mL) và dung dịch nước NaCl bão hoà (100mL). Làm khô pha hữu cơ qua K₂CO₃, lọc để loại bỏ chất rắn, và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được dầu màu vàng. Đưa nguyên liệu thô này đi sắc ký nhanh trên silicagel rửa giải bằng gradient từ 20% đến 100% EtOAc/hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu không màu với độ tinh khiết khoảng 90% bằng phép phân tích ¹H NMR (6,50g, hiệu suất 64%). Phổ khối (*m/z*) 264 (M + H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,27 (dd, *J* = 8,5, 7,3 Hz, 2H), 6,93 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,10 (app t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,29 (dd, *J* = 8,4, 4,0 Hz, 1H), 3,14 (app dt, *J* = 11,3, 6,4 Hz, 1H), 2,95 (app dt, *J* = 13,7, 6,1 Hz, 1H), 2,89 (app dt, *J* = 13,7, 6,1 Hz, 1H), 2,42 (ddd, *J* = 11,6, 7,9, 3,7 Hz, 1H), 1,90–1,82 (m, 1H), 1,79 (app td, *J* = 8,9, 3,8 Hz, 1H), 1,67–1,59 (m, 3H), 1,39 (app td, *J* = 8,8, 4,0 Hz, 1H).

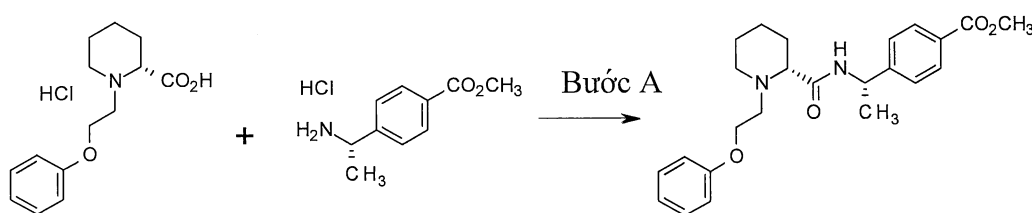
Ví dụ điều chế 12

Điều chế hydroclorua của axit (*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin carboxylic.



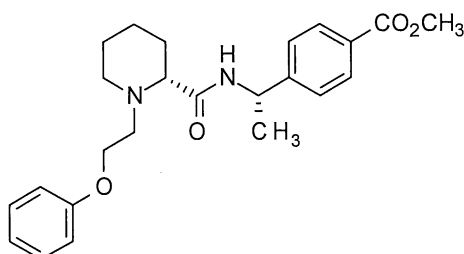
Sơ đồ 6, Bước B: Ở nhiệt độ trong phòng, hoà tan methyl (*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-carboxylat (6,50g, 22,2mmol) trong THF (11,1mL) và thêm NaOH (dung dịch nước 5M, 8,89mL, 44,4mmol) và gia nhiệt đến 65°C qua đêm đồng thời khuấy. Thêm hydroclorua (dung dịch nước 5M) cho đến khi độ pH của pha nước đạt đến 1,0. Rửa pha nước bằng CH₂Cl₂ (3 × 75mL). Cô đặc pha nước trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn màu trắng. Nghiền chất rắn bằng EtOH (50mL), lọc để loại bỏ muối được tạo huyền phù và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (5,17g, hiệu suất 81%). Phổ khối (*m/z*) 250 (*M* + *H*)⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,31 (dd, *J* = 8,8, 7,5 Hz, 2H), 7,02–6,97 (m, 3H), 4,47 (AB-cặp đôi ddd, *J* = 11,5, 7,1, 3,0 Hz, 1H), 4,38 (AB-cặp đôi ddd, *J* = 11,8, 6,3, 3,1 Hz, 1H), 4,15 (dd, *J* = 11,2, 2,8 Hz, 1H), 3,80 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 3,73–3,68 (m, 2H), 3,29 (app td, *J* = 13,2, 3,8 Hz, 1H), 2,35 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 2,00–1,80 (m, 4H), 1,68 (app t, *J* = 13,1 Hz, 1H).

Sơ đồ 7



Bước 13

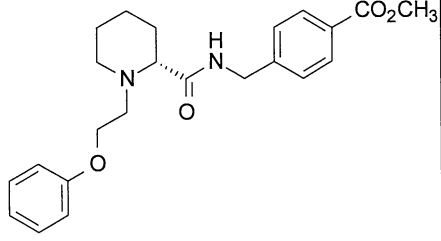
Điều chế methyl 4-[(1*S*)-1-[[2*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-carbonyl]amino]etyl]benzoat.

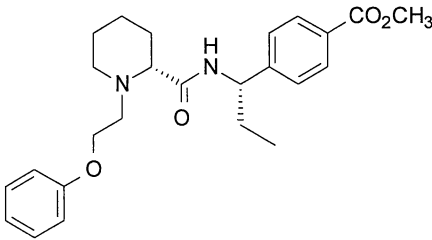
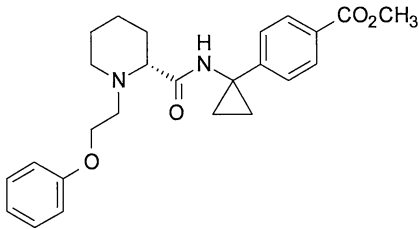


Sơ đồ 7, Bước A: Hoà tan hydroclorua của axit (*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin carboxylic (750mg, 2,62mmol) và methyl (*S*)-4-(1-aminoetyl)benzoat hydroclorua

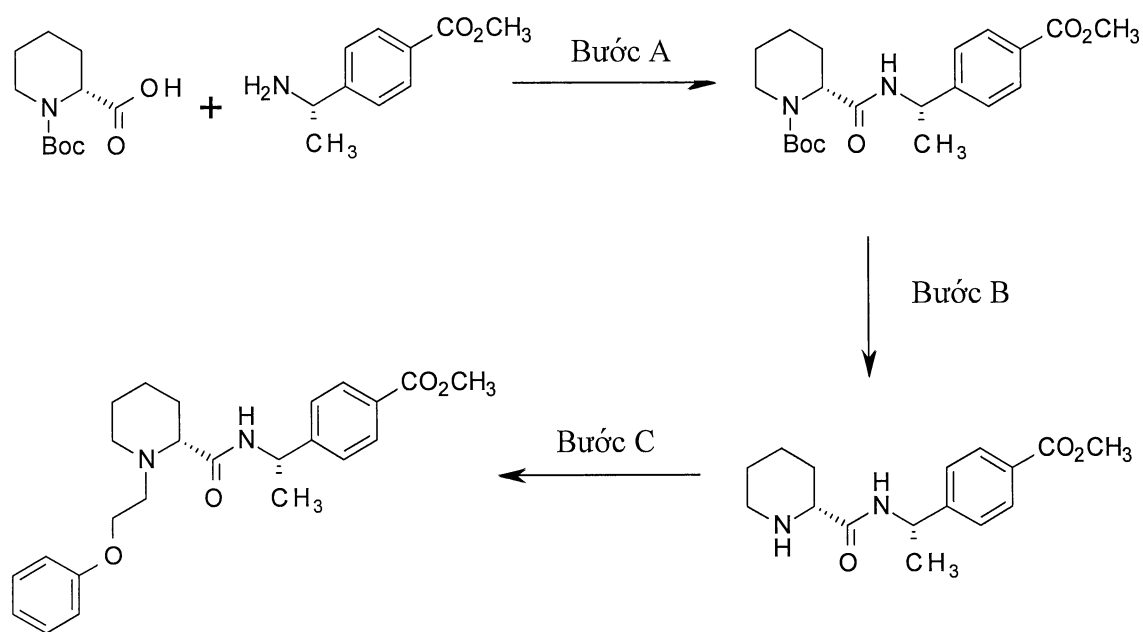
(566mg, 2,62mmol) trong DMF (5,25mL) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung triethylamin (1,65mL, 11,81mmol) vào, sau đó thêm BOP (1,51g, 3,41mmol) vào. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ, sau đó pha loãng bằng EtOAc (25mL). Rửa hỗn hợp bằng dung dịch nước LiCl bão hoà (2 × 25mL). Làm khô lớp hữu cơ bằng MgSO₄, lọc để loại bỏ chất rắn, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Đưa chất dầu màu vàng-cam thu được đi sắc ký nhanh trên silicagel, rửa giải bằng gradient từ 0% đến 100% EtOAc/hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (930mg, hiệu suất 86%). Phổ khối (*m/z*) 411 (*M* + *H*)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,13 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,86 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,43 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,24 (dd, *J* = 8,8, 7,4 Hz, 2H), 6,89 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,85 (dd, *J* = 8,8, 1,0 Hz, 2H), 4,96 (app pentet, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,05–3,98 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,11 (app dt, *J* = 11,4, 3,7 Hz, 1H), 2,81 (dd, *J* = 7,2, 2,8 Hz, 1H), 2,77 (app q, *J* = 6,8 Hz, 1H), 2,50 (app dt, *J* = 11,2, 6,8 Hz, 1H), 2,15 (app td, *J* = 11,6, 2,8 Hz, 1H), 1,68–1,61 (m, 2H), 1,59–1,40 (m, 3H), 1,36 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,27–1,18 (m, 1H).

Điều chế các hợp chất sau hầu như bằng phương pháp nêu trong ví dụ điều chế 13, sử dụng muối amoni thích hợp thay cho methyl (*S*)-4-(1-aminoethyl)benzoat hydroclorua:

Điều chế số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (<i>m/z</i>)
14	methyl 4-[[[(2 <i>R</i>)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-carbonyl]amino]methyl]benzoat		397 (<i>M</i> + <i>H</i>) ⁺

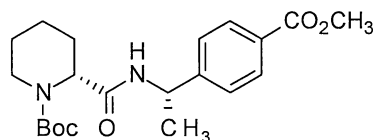
15	metyl 4-[(1 <i>S</i>)-1-[[<i>(2R)</i> -1-(2-phenoxyetyl)pipericcin-2-cacbonyl]amino]propyl]benzoat		425 (M + H) ⁺
16	metyl 4-[1-[[<i>(2R)</i> -1-(2-phenoxyetyl)pipericcin-2-cacbonyl]amino]xyclopropyl]benzoat		423 (M + H) ⁺

Sơ đồ 8



Ví dụ điều chế 17

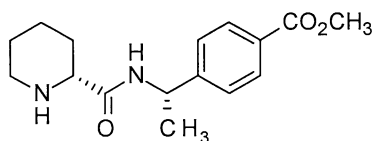
Điều chế methyl 4-[(1*S*)-1-[[*(2R)*]-piperidin-1-*tert*-butoxycarbonyl]-2-carbonyl]amino]ethyl]benzoat.



Sơ đồ 8, Bước A: Bổ sung triethylamin (13,4mL, 96,0mmol) vào hỗn hợp gồm axit (*R*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylpiperic (20,0g, 87,2mmol) và CH₂Cl₂ (400mL) ở 0°C. Sau đó, thêm nhỏ giọt isobutyl cloformat (12,5mL, 96,0mmol) vào và khuấy trong 20 phút. Thêm methyl 4-[(*S*)-aminoethyl]benzoat (17,2g, 96,0mmol) vào, sau đó để hỗn hợp ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong một giờ. Thêm nước (300mL) vào, sau đó tách các lớp và rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước KHSO₄ 1M (200mL), tiếp theo thêm dung dịch nước NaCl bão hoà (200mL) vào. Tách lớp hữu cơ và làm khô bằng MgSO₄, sau đó lọc để loại bỏ chất rắn và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu không màu (34,0g, hiệu suất 100%). Phổ khối (*m/z*) 291 (*M* – Boc + 2H)⁺, 413 (*M* + Na)⁺. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,99 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 5,14 (app pentet, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,72 (br s, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,40 (dd, *J* = 6,2, 5,8 Hz, 1H), 2,63 (app td, *J* = 6,9, 2,4 Hz, 1H), 2,25 (br s, 1H), 1,75 (app tq, *J* = 13,4, 6,7 Hz, 1H), 1,63–1,50 (m, 3H), 1,47 (s, 9H), 1,38 (app t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 0,91 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H).

Ví dụ điều chế 18

Điều chế methyl 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-piperidin-2-carbonyl]amino]etyl]benzoat

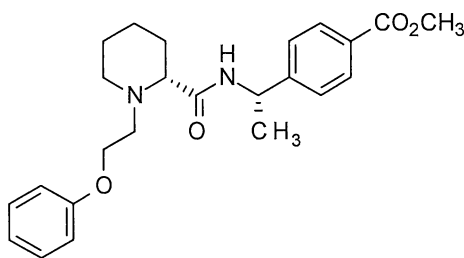


Sơ đồ 8, Bước B: Bổ sung nhỏ giọt axetyl clorua (62,0mL, 871mmol) vào hỗn hợp gồm EtOAc (136 mL) và EtOH (55,8mL) ở 0°C, sau đó để hỗn hợp ấm đến nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 30 phút. Thêm dung dịch chứa methyl 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-piperidin-1-*tert*-butoxycarbonyl-2-carbonyl]amino]etyl]benzoat (34,0g, 87,1mmol) trong EtOAc (136mL) vào, sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Chiết hỗn hợp bằng nước (2 × 100mL), sau đó thêm dung dịch nước amoniac 32% vào các lớp nước gom lại cho đến khi độ pH đạt đến 10. Chiết hỗn hợp bằng TBME (2 × 200mL), sau đó làm khô các lớp hữu cơ gom lại bằng

MgSO₄, lọc để loại bỏ chất rắn, và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (20,2g, hiệu suất 80%).
 Phổ khối (m/z) 291 ($M + H$)⁺, 581 ($2M + H$)⁺. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8,00 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,15 (br d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 5,14 (app pentet, $J = 7,4$ Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,23 (dd, $J = 9,9, 3,3$ Hz, 1H), 3,01 (app dt, $J = 11,8, 3,5$ Hz, 1H), 2,68 (ddd, $J = 12,1, 10,7, 3,0$ Hz, 1H), 1,98–1,90 (m, 1H), 1,61–1,52 (m, 1H), 1,48 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,43–1,34 (m, 2H).

Ví dụ điều chế 19

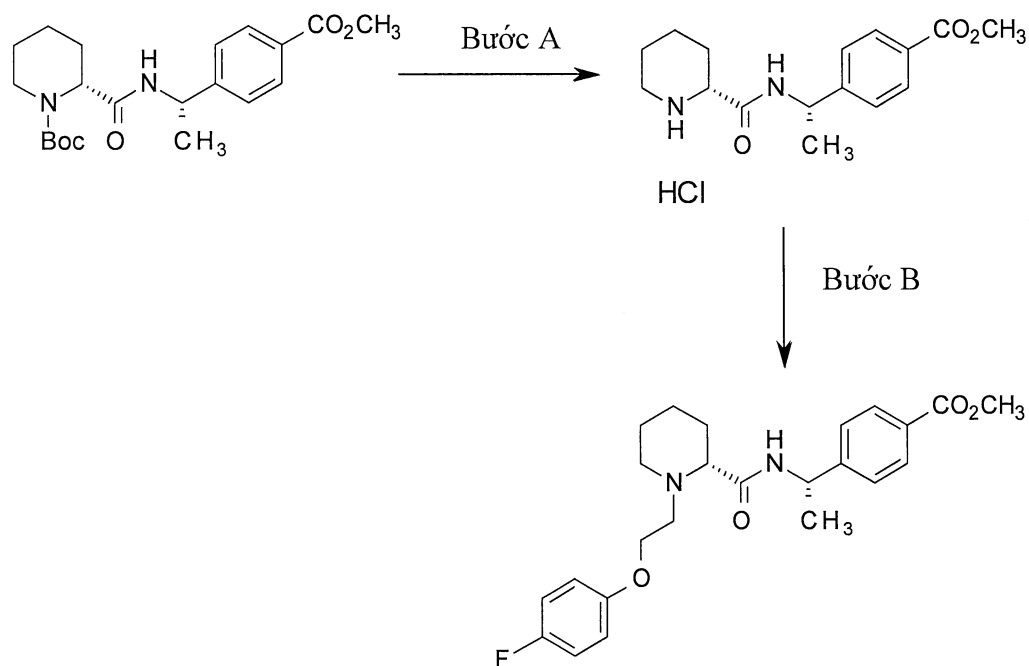
Điều chế methyl 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat.



Sơ đồ 8, Bước C: Bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa NaIO₄ (35,0g, 161,9mmol) trong nước (235mL) vào huyền phù chứa silicagel (100g) trong CH₂Cl₂ (705mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp trong 30 phút, sau đó thêm 1,2-đihydroxy-3-phenoxypropan (21,5g, 121,4mmol), và khuấy hỗn hợp trong 30 phút nữa. Lọc hỗn hợp để loại bỏ chất rắn và tách các lớp của phần dịch lọc. Làm khô lớp hữu cơ bằng MgSO₄, và lọc để loại bỏ chất rắn. Thêm methyl 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat (23,5g, 80,9mmol) vào phần dịch lọc, tiếp theo thêm từng phần nhỏ natri triaxetoxymethydrat (35,7g, 161,9mmol) vào. Khuấy trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó thêm 32% dung dịch nước amoniac cho đến khi độ pH đạt đến 10. Tách các lớp và làm khô pha hữu cơ bằng MgSO₄. Lọc để loại bỏ chất rắn, sau đó cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được vật liệu thô. Hoà tan vật liệu trong EtOAc (300mL) và lọc qua đệm chứa silicagel (30g). Cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được 36g nguyên liệu. Thêm TBME (180mL) và gia nhiệt đến 50°C. Trong khi duy trì nhiệt độ ở 50°C, thêm hexan (360mL) vào trong

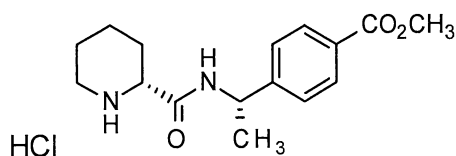
15 phút, sau đó khuấy trong một giờ. Để hỗn hợp nguội đến nhiệt độ trong phòng, sau đó tách chất rắn bằng cách lọc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (16,7g, hiệu suất 50%).

Sơ đồ 9



Ví dụ điều chế 20

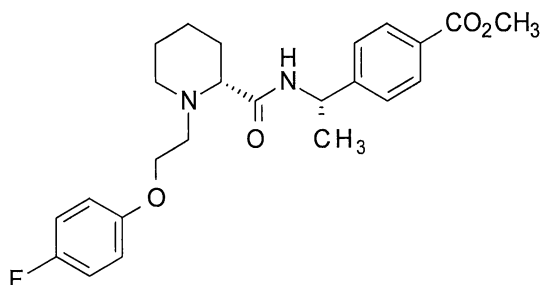
Điều chế methyl 4-[(1S)-1-[(2R)-piperidin-2-carbonyl]amino]ethyl]benzoat hydroclorua.



Sơ đồ 9, Bước A: Xử lý methyl 4-[(1S)-1-[(2R)-piperidin-1-*tert*-butoxycarbonyl-2-carbonyl]amino]ethyl]benzoat (7,80g, 19,98mmol) bằng axit clohydric (dung dịch 4M trong 1,4-dioxan, 25,0mL, 99,9mmol) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Cô hỗn hợp trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (6,0g, hiệu suất 92%). Phổ khối (m/z) 291 ($M + H$)⁺, 581 ($2M + H$)⁺, 603 ($2M + Na$)⁺.

Ví dụ điều chế 21

Điều chế methyl 4-[(1*S*)-1-[[*(2R)*-1-(2-(4-flophenoxy)etyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat.

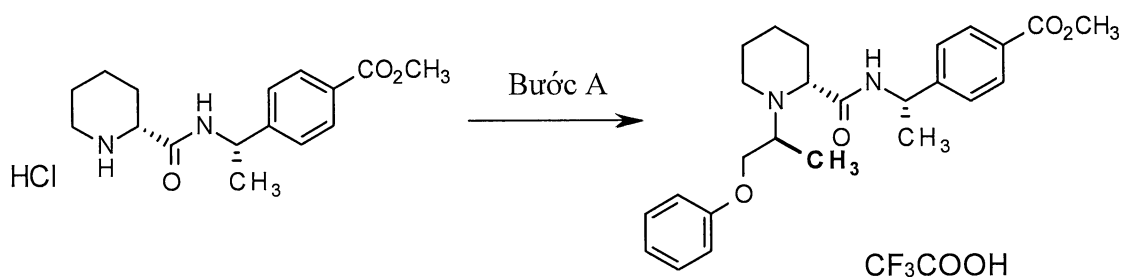


Sơ đồ 9, Bước B: Khuấy hỗn hợp gồm methyl 4-[(1*S*)-1-[[*(2R)*-piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat hydroclorua (650mg, 1,99mmol) và 2-(4-flophenoxy)axetalđehyt (337mg, 2,19mmol) trong DCE (9,9mL) ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Thêm axit axetic (0,113mL, 1,99mmol) và natri triaxetoxylborohyđrua (590mg, 2,78mmol) vào và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong ba ngày. Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hoà (25mL) và chiết lớp nước bằng EtOAc (2 × 25mL). Rửa các lớp hữu cơ gom lại bằng dung dịch nước NaCl bão hoà (25mL), sau đó làm khô pha hữu cơ bằng MgSO₄, lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm. Đưa dầu thu được đi sắc ký nhanh trên silicagel, rửa giải bằng gradient từ 0% đến 100% EtOAc/hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng (600mg, hiệu suất 70%). Phổ khối (*m/z*) 429 (M + H)⁺, 451 (M + Na)⁺.

Điều chế các hợp chất sau đây hầu như bằng phương pháp nêu trong ví dụ điều chế 21, sử dụng aldehyt thích hợp thay cho 2-(4-flophenoxy)axetalđehyt:

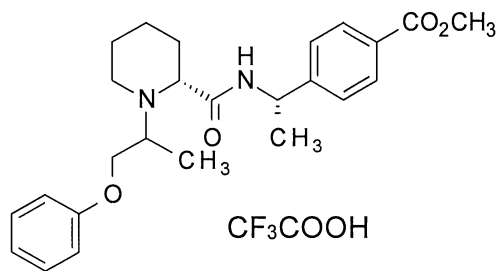
Điều chế số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (m/z)
22	metyl 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2-(4-xyanophenoxy)etyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat		436 ($M + H$) ⁺
23	metyl 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2-(2-metylphenoxy)etyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat		425 ($M + H$) ⁺ , 447 ($M + Na$) ⁺
24	metyl 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2-xyclohexyloxy etyl)piperidin-2-cacbonyl] amino]etyl]benzoat		417 ($M + H$) ⁺ , 439 ($M + Na$) ⁺

Sơ đồ 10



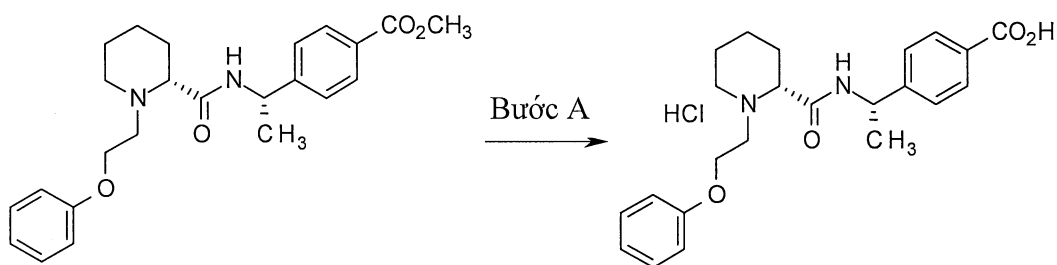
Ví dụ điều chế 25

Điều chế metyl 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-1-(1-metyl-2-phenoxyetyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat trifloaxetat.



Sơ đồ 10, Bước A: Khuấy hỗn hợp gồm methyl 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-piperidin-2-carbonyl]amino]etyl]benzoat hydroclorua (150mg, 0,46mmol), 1-phenoxy-2-propanon (69 μL , 0,50mmol), DCE (2,3mL), axit axetic (26 μL , 0,46mmol), và natri triaxetoxibohyđrua (136mg, 0,64mmol) ở 65°C trong hai ngày. Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hoà (75mL) và chiết lớp nước bằng EtOAc (75mL). Làm khô pha hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm. Đưa nguyên liệu thô đi sắc ký pha đảo trên C18 silicagel, rửa giải bằng 0,1% TFA với gradient từ 5% đến 50% ACN/nước. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn trong điều kiện áp suất giảm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng dầu màu vàng nhạt trong hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ 2:1 (24mg, hiệu suất 10%). Phổ khối (m/z) 425 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

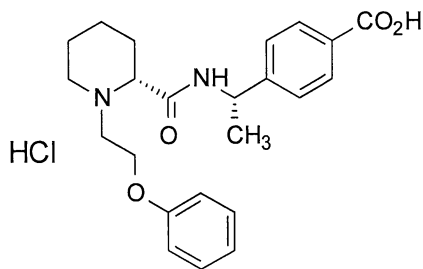
Sơ đồ 11



Ví dụ 1

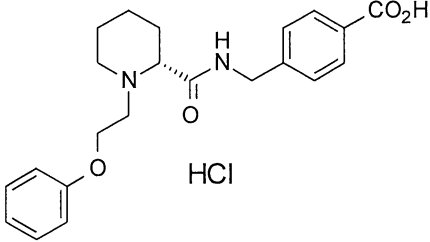
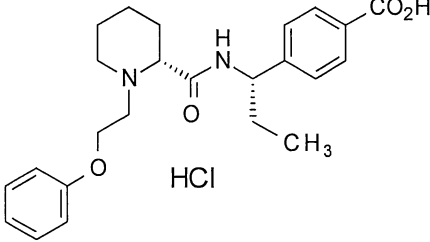
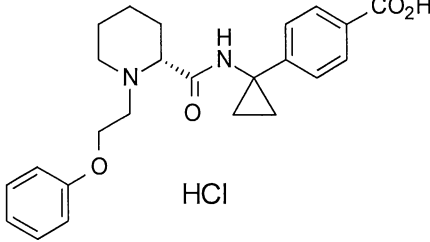
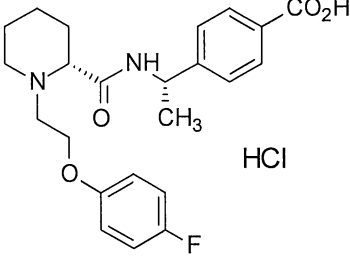
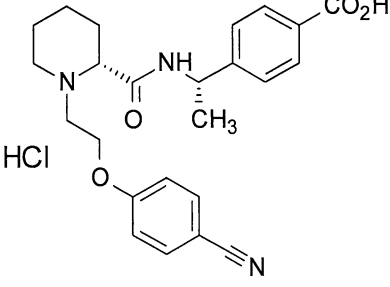
Ví dụ 1

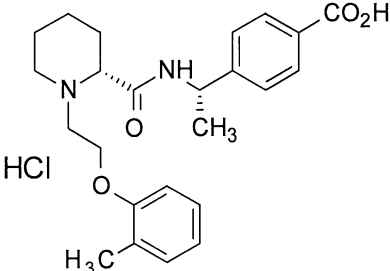
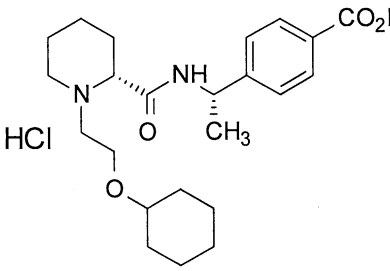
Điều chế hydroclorua của axit 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-1-(2-phenoxyetyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoic.



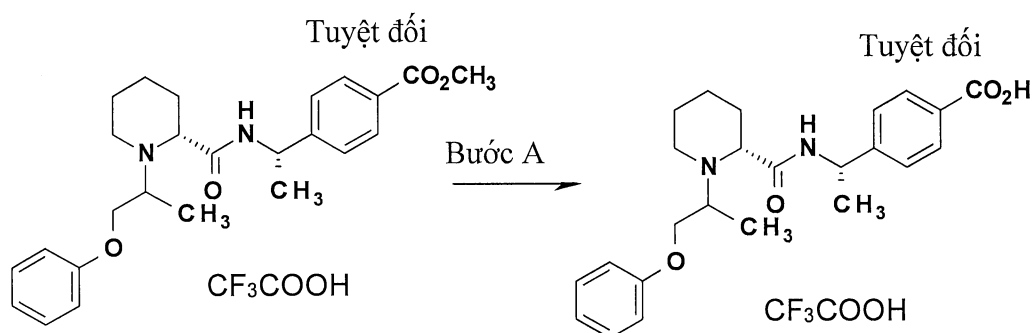
Sơ đồ 11, Bước A: Hoà tan methyl 4-[(1*S*)-1-[[[(2*R*)-1-(2-phenoxyethyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat (930mg, 2,27mmol) trong THF (4,0mL) và CH₃OH (4,0mL) ở nhiệt độ trong phòng. Thêm NaOH (dung dịch nước 1M, 4,5mL, 4,5mmol), sau đó khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong ba ngày. Cô hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn có tính dính. Thêm hydroclorua (dung dịch 4M trong đioxan, 2mL, 8mmol), và khuấy mạnh trong 10 phút. Loại bỏ chất rắn được tạo huyền phù bằng cách lọc và cô phần dịch lọc trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn màu trắng. Nghiền chất rắn trong dietyl ete đang sôi (25mL), và tách chất rắn được tạo huyền phù bằng việc lọc để thu được hợp chất nêu ở đề mục này (650mg, hiệu suất 66%) ở dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối (*m/z*): 397 (M + H)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,89 (br s, 1H), 10,08 (br s, 1H), 9,41 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,88 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,47 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,26 (dd, *J* = 8,4, 7,6 Hz, 2H), 6,96 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 5,02 (app pentet, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,34–4,21 (m, 2H), 4,03 (app t, *J* = 10,2 Hz, 1H), 3,57 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 3,48–3,39 (m, 1H), 3,37–3,18 (m, 2H), 2,15 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 1,82–1,66 (m, 4H), 1,50–1,43 (m, 1H), 1,39 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H).

Điều chế các hợp chất sau đây hầu như bằng phương pháp nêu trong Ví dụ 1, sử dụng methyl este thích hợp thay cho methyl 4-[(1*S*)-1-[[[(2*R*)-1-(2-phenoxyethyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoat:

Ví dụ số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (<i>m/z</i>)
2	Hydroclorua của axit 4-[[[(2 <i>R</i>)-1-(2- phenoxyetyl)piperidin- 2-cacbonyl]amino]- metyl]benzoic		383 (M + H) ⁺
3	Hydroclorua của axit 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2- phenoxyetyl)piperidin- 2-carbonyl]amino]- propyl]benzoic		411 (M + H) ⁺
4	Hydroclorua của axit 4-[1-[[[(2 <i>R</i>)-1-(2- phenoxyetyl)piperidin- 2-cacbonyl]amino]- xyclopropyl]benzoic		409 (M + H) ⁺
5	Hydroclorua của axit 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2- (4-flophenoxy)etyl)- piperidin-2-cacbonyl]- amino]etyl]benzoic		415 (M + H) ⁺
6	Hydroclorua của axit 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2- (4-xyanophenoxy)- etyl)piperidin-2- cacbonyl]amino]etyl]- benzoic		422 (M + H) ⁺

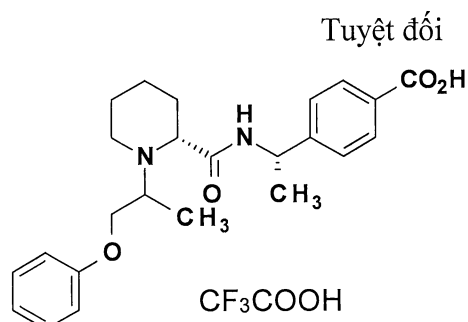
Ví dụ số	Tên hoá học	Cấu trúc	MS (<i>m/z</i>)
7	Hydroclorua của axit 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2-(2-metylphenoxy)-etyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]-benzoic		411 (M + H) ⁺
8	Hydroclorua của axit 4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-1-(2-xyclohexyloxyetyl)-piperidin-2-cacbonyl]-amino]etyl]benzoic		403 (M + H) ⁺

Sơ đồ 12



Ví dụ 9

Điều chế trifloaxetat của axit 4-[(1*S*)-1-[(2*R*)-1-(1-metyl-2-phenoxyetyl)piperidin-2-cacbonyl]amino]etyl]benzoic.



Sơ đồ 12, Bước A: Hoà tan methyl 4-[(1*S*)-1-[[*(2R)*-1-(1-methyl-2-phenoxyethyl)piperidin-2-carbonyl]amino]ethyl]benzoat trifloaxetat (24mg, 0,045mmol) trong THF (226μL) và xử lý hỗn hợp bằng metanol (226μL) và natri hydroxit (dung dịch nước 1N, 170μL, 0,17mmol). Khuấy hỗn hợp qua đêm ở nhiệt độ trong phòng, sau đó cô trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất rắn có tính dính. Đưa nguyên liệu thô này đi sắc ký pha đảo trên C18 silicagel, rửa giải bằng 0,1% TFA với gradient từ 5% đến 50% ACN/nước để thu được hai phân đoạn riêng rẽ, mỗi phân đoạn chứa chất đồng phân không đối quang riêng rẽ của sản phẩm. Cô mỗi phân đoạn trong điều kiện áp suất giảm, hoà tan mỗi phân đoạn trong thể tích tối thiểu metanol, nghiền mỗi phân đoạn bằng diethyl ete (5mL), và cô mỗi phân đoạn trong điều kiện áp suất giảm để thu được chất đồng phân 1 (3,0mg, hiệu suất 13%) và chất đồng phân 2 (1,1mg, hiệu suất 5%) của hợp chất nêu ở đề mục này ở dạng chất rắn màu trắng.

Ví dụ 9a: Chất đồng phân chủ yếu (chất đồng phân 1). Phổ khối (m/z): 411 ($M + H$)⁺. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9,75 (br s), 9,30 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,43 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,33–7,25 (m, 2H), 7,04–6,95 (m, 3H), 5,03 (app p, $J = 6,8$ Hz, 1H), 4,35–4,24 (m, 2H), 4,07 (dd, $J = 12,1, 3,5$ Hz, 1H), 3,74–3,65 (m, 1H), 3,52 (br d, $J = 12,5$ Hz, 1H), 3,11–2,99 (m, 1H), 2,15 (br d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 1,89–1,71 (m, 4H), 1,52–1,45 (m, 1H), 1,40 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,33 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

Ví dụ 9b: Chất đồng phân thứ yếu (chất đồng phân 2). Phổ khối (m/z): 411 ($M + H$)⁺.

Chuyên gia trong lĩnh vực này đã nhận thức rõ rằng các muối HCl trong các ví dụ từ 1 đến 9 được chuyển hoá một cách dễ dàng thành các bazơ tự do tương ứng bằng cách sử dụng các điều kiện đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Gắn kết *in Vitro* với EP1, EP2, EP3, và EP4 của người

Các màng hEP1 và hEP4 được tạo ra từ tế bào HEK293 tái tổ hợp biểu hiện ổn định các thụ thể EP1 của người (Số hiệu lưu trữ Genbank AY275470) hoặc EP4 của người (Số hiệu lưu trữ Genbank AY429109). Các màng hEP2 và hEP3 được tạo ra từ

tế bào HEK293 được chuyển nhiễm một cách tạm thời với plasmid thụ thể EP2 (Số hiệu lưu trữ Genbank AY275471) hoặc EP3 (isoform VI: Số hiệu lưu trữ Genbank AY429108). Viên kết tế bào đông lạnh được đông hóa trong dung dịch đệm đông hoá bằng cách sử dụng thiết bị đông hóa Teflon/ thuỷ tinh. Protein màng được tạo dịch lỏng và làm đông lạnh nhanh trên đá khô trước khi lưu trữ ở -80°C . Dung dịch đệm đông hóa chứa 10mM Tris-HCl, độ pH=7,4, 250mM sucroza, 1mM EDTA, 0,3mM indomethaxin và plus Complete™, với EDTA, thu được từ Roche Molecular Biochemicals (Catalog Number 1 697 498).

Các trị số K_d đối với $[^3\text{H}]\text{-PGE}_2$ gắn kết với mỗi thụ thể được xác định bằng các nghiên cứu gắn kết bão hoà hoặc sự cạnh tranh đồng nhất. Các hợp chất được thử nghiệm trong đĩa 96 lỗ sử dụng các dây pha loăng gấp ba lần để tạo ra đường cong 10 điểm. Hợp chất đã pha loăng được ủ với 20 μg màng EP1/giếng, 10 μg màng EP2/giếng, 1 μg màng EP3/giếng hoặc từ 10 đến 20 μg màng EP4/giếng trong 90 phút ở 25°C với sự có mặt của từ 0,3 đến 0,5nM $[^3\text{H}]\text{-PGE}_2$ (PerkinElmer, từ 118 đến 180 Ci/mmol). Phản ứng gắn kết được thực hiện trong 200 μL dung dịch đệm MES (10mM MES độ pH=6,0 với KOH, 10mM MgCl_2 và 1mM EDTA) bằng cách sử dụng đĩa lỗ sâu 96 lỗ polystyrene 0,5mL. Việc gắn kết không đặc hiệu được tính toán bằng cách so sánh sự gắn kết khi có mặt và không có mặt 2 μM PGE_2 . Màng được thu gom bằng cách lọc (thiết bị thu gom TomTek), rửa 4 lần bằng dung dịch đệm lạnh (10mM MES độ pH=6,0 với KOH, 10mM MgCl_2), sấy trong lò 60°C và hoạt tính phóng xạ được định lượng theo số lượng/phút (CPM) sử dụng bộ dò TopCount. Phần trăm gắn kết đặc hiệu được tính toán là phần trăm gắn kết khi không có mặt chất ức chế bất kỳ, được hiệu chỉnh đối với việc gắn kết khi có mặt 2 μM PGE_2 . Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương trình logistic không tuyến tính 4 tham số (ABase Equation 205) như được thể hiện: $y = (A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D))))$ trong đó, y = % ức chế đặc hiệu, A = đáy đường cong; B = đỉnh đường cong; $C = \text{IC}_{50}$ tương đối = nồng độ gây ức chế 50% dựa trên khoảng dữ liệu từ đỉnh đến đáy; D = Hill Slope = độ dốc của đường cong. Sự chuyển hoá K_i từ giá trị IC_{50} ($K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [L]/K_d)$ trong đó $[L]$ là nồng độ phối tử). Các hợp chất của các ví dụ từ 1 đến 9 ở đây được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả trên đây và thể hiện trị số K_i đối với hEP4 nhỏ hơn khoảng 1 μM .

Bảng 1: Gắn kết *in vitro* của hợp chất nêu trong ví dụ 1 với EP1, EP2, EP3 và EP4 của người

Hợp chất thử nghiệm	hEP1, K_i (nM)	hEP2, K_i (nM)	hEP3, K_i (nM)	hEP4, K_i (nM)
Ví dụ 1	>17500	1550 $\pm$ 1860 (n=3)	>14000	54 $\pm$ 27 (n=7)

Cụ thể hơn là, theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, các dữ liệu trong bảng 1 chứng minh rằng hợp chất nêu trong ví dụ 1 gắn kết với hEP4 ở nồng độ nanomol thấp. Các dữ liệu trong bảng 1 cũng chứng minh rằng hợp chất nêu trong ví dụ 1 gắn kết với hEP4 mạnh hơn nhiều so với hEP1, hEP2, và hEP3 cho thấy tính chọn lọc đối với thụ thể hEP4.

Hoạt tính chất đối kháng chức năng EP4 của người *in vitro*

Các thử nghiệm được thực hiện trong các tế bào HEK293 tái tổ hợp biểu hiện ổn định thụ thể EP4 của người. Các dòng tế bào được duy trì bằng cách nuôi cấy trong DMEM với glucoza ở mức cao và pyridoxin hydroclorua (Invitrogen) được bổ sung với 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 1mM natri pyruvat, 10mM HEPES, 500 μ g/mL geneticin và 2mM L-glutamin. Môi trường nuôi cấy hợp dòng được sinh trưởng ở 37°C trong không khí chứa 5% CO₂. Tế bào được thu gom bằng cách sử dụng 2,5% Trypsin-EDTA, được tạo huyền phù trong môi trường đông lạnh (FBS với 6% DMSO) ở mật độ 10⁷ tế bào/mL và các phần phân ước được lưu trữ trong nitơ lỏng. Ngay trước khi thử nghiệm, tế bào được rã đông trong DMEM, ly tâm và tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm cAMP.

Mức ức chế sản sinh cAMP được kích thích bởi PGE₂ bởi chất đối kháng EP4 được đo bằng cách sử dụng HTRF (Cisbio catalogue # 62AM4PEB). Một phần phân ước tương đương với 4000 tế bào được ủ với 50 μ L dung dịch đệm thử nghiệm cAMP chứa PGE₂ với nồng độ định trước để tạo ra EC₈₀ (0,188nM PGE₂ từ Sigma, catalog # P5640-10mg) và chất đối kháng EP4 ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Dung dịch

đệm thử nghiệm cAMP chứa 500mL HBSS, 0,1% BSA, 20mM HEPES và 200 μ M IBMX (Sigma I5879). CJ-042794 (axit 4-{(1S)-1-[(5-clo-2-[(4-flophenyl)oxy]phenyl} cacbonyl)amino]etyl}benzoic) được dùng làm mẫu đối chứng dương tính. Để đo hàm lượng cAMP, thể tiếp hợp cAMP-d2 và thể tiếp hợp kháng cAMP-cryptat trong dung dịch đệm làm tan được ủ với tế bào được xử lý ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Tín hiệu HTRF được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa EnVision® (Perkin-Elmer) để tính toán tỷ lệ phát huỳnh quang ở 665nm so với tỷ lệ phát huỳnh quang ở 620nm. Dữ liệu thô này được chuyển thành lượng cAMP (pmol/giếng) bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP được tạo ra đối với mỗi thử nghiệm. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương trình logistic không tuyến tính 4 tham số (ABase Equation 205) như được thể hiện: $y = \frac{A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))}{1}$ trong đó, y = % ức chế đặc hiệu, A = đáy đường cong, B = đỉnh đường cong, C = IC_{50} tương đối = nồng độ gây ức chế 50% dựa trên khoảng dữ liệu từ đỉnh đến đáy, D = Hill, Slope = độ dốc của đường cong.

Theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, các hợp chất nêu trong các ví dụ từ 1 đến 9 ở đây được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả trên đây, và thể hiện IC_{50} nhỏ hơn khoảng 1 μ M. Cụ thể hơn là, theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, hợp chất nêu ở ví dụ 1 có IC_{50} bằng $6,9 \pm 2,5$ nM ($n=5$) được đo ở EP4 của người. Điều này chứng minh rằng các hợp chất nêu trong các ví dụ từ 1 đến 9 là các chất đối kháng hiệu nghiệm của EP4 của người *in vitro*.

Hoạt tính của chất đối kháng chức năng EP4 của chuột cống *in vitro*

ADN bổ trợ EP4 của chuột (Số hiệu lưu trữ Genbank# NM_03276) được tạo dòng vào vector pcDNA 3.1 và tiếp theo được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293 để biểu hiện thụ thể. Dòng ổn định EP4 của chuột cống được định mức và sau đó làm đông lạnh làm ngân hàng tế bào để sàng lọc các hợp chất tiếp theo. Để thử nghiệm các hợp chất đối kháng EP4 trong tế bào rEP4, làm rã đông tế bào đã đông lạnh và sau đó tạo huyền phù chứa tế bào trong dung dịch đệm thử nghiệm cAMP. Dung dịch đệm cAMP được tạo ra bằng HBSS mà không cần Phenol Red (Hyclone, SH30268) được bổ sung với 20mM HEPES (Hyclone, SH30237), 0,1% BSA (Gibco, 15260) và

125 μ M IBMX (Sigma, I5879). Tế bào được đưa lên đĩa màu đen polystyren đáy tròn phẳng nửa diện tích 96 lỗ (Costar 3694). Các hợp chất được pha loãng theo dãy bằng DMSO để thu được các đường cong đáp ứng nồng độ 10 điểm. Sau đó, thêm các hợp chất được pha loãng vào dung dịch đệm thử nghiệm cAMP chứa PGE₂ (Cayman 14010, với nồng độ được định trước để tạo ra EC₈₀) ở tỷ lệ DMSO/dung dịch đệm là 1/100. Tế bào được xử lý bằng các hợp chất với sự có mặt của PGE₂ (nồng độ EC₈₀) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hàm lượng cAMP được sản sinh từ tế bào được định lượng bằng kit thử nghiệm cAMP HTRF (Cisbio 62AM4PEC). Đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa EnVision sử dụng phương thức tối ưu HTRF (PerkinElmer). IC₅₀ được tính toán bằng cách sử dụng fit đường cong đáp ứng liều sigmoidal hồi quy không tuyến tính Graphpad Prism (v. 4).

Theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, các hợp chất của các ví dụ từ 1 đến 9 ở đây được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả trên đây và thể hiện IC₅₀ nhỏ hơn khoảng 1 μ M. Cụ thể hơn là, theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, hợp chất của ví dụ 1 có IC₅₀ bằng 15nM được đo ở EP4 của chuột. Điều này chứng minh rằng các hợp chất của các ví dụ từ 1 đến 9 là các chất đối kháng hiệu nghiệm của EP4 của chuột *in vitro*.

Hoạt tính của chất đối kháng *in Vitro* ở máu nguyên chất của người

Các tác dụng ức chế của PGE₂ đối với việc sản sinh TNF α được cảm ứng bởi LPS từ đại thực bào/bạch cầu đơn nhân được tin là do các thụ thể EP4 gây ra (xem Murase, A., et al., Life Sciences, 82:226-232 (2008) chẳng hạn). Khả năng hợp chất nêu trong ví dụ 1 làm đảo ngược tác dụng ức chế của PGE₂ đối với việc sản sinh TNF α được cảm ứng bởi LPS ở dòng máu nguyên chất của người là dấu hiệu cho thấy hợp chất này có hoạt tính chức năng.

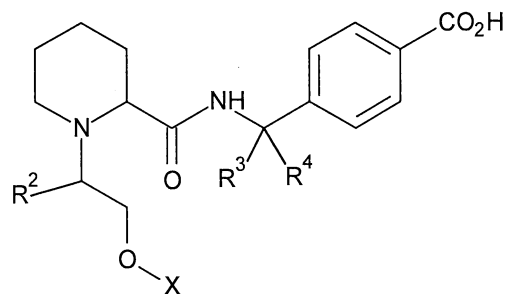
Máu được gom từ người cho tự nguyện thông thường vào ống natri heparin vacutainer. Người cho không phải dùng NSAID hoặc celecoxib trong 48 giờ hoặc glucocorticoid trong hai tuần trước khi cho máu. Tất cả các ống/người cho được gom vào ống ly tâm hình nón 50mL Falcon và 98 μ L/lỗ được phân bố vào các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ (Falcon 3072). Các hợp chất được pha loãng vào DMSO đến nồng độ cuối

loãng gấp 100 lần và 1 μ L hợp chất/lỗ được bổ sung vào máu, mỗi mẫu được lặp lại ba lần để thu được đường cong đáp ứng nồng độ 7 điểm. Máu được xử lý sơ bộ bằng các hợp chất ở 37°C, trong không khí ẩm chứa 5% CO₂, trong 30 phút, sau đó 1 μ L/giếng dung dịch chứa 1mg/mL lipopolysaccharit (LPS) (Sigma 0111:B4) trong 0,2mg/mL albumin huyết thanh bò (BSA)/PBS có và không có 1mM PGE₂ (Cayman 14010) được bổ sung vào để thu được nồng độ LPS cuối cùng bằng 10 μ g/mL có và không có 10nM PGE₂. Các đĩa được ủ trong từ 20 đến 24 giờ ở 37°C trong không khí ẩm chứa 5% CO₂. Các đĩa được ly tâm ở 1800 $\times$ g trong 10 phút ở 22°C, trong máy ly tâm Eppendorf 5810R. Huyết tương được loại bỏ ra khỏi lớp tế bào và được chuyển vào các đĩa polypropylen đáy hình chữ v. Hàm lượng TNF α trong 2 μ L huyết tương được định lượng bằng thử nghiệm miễn dịch enzym có bán trên thị trường (R&D Systems DY210), sử dụng các đĩa Immulon 4 HBX (Thermo 3855) và chất nền 3,3',5,5' tetrametylbiphenyl-4,4'-diamin (KPL 50-76-03). Các đĩa được đọc ở A₄₅₀-A₆₅₀ trên thiết bị đọc đĩa (Molecular Devices Versamax) sử dụng phần mềm SOFTmaxPRO (v. 4.3.1). IC₅₀ được tính toán sử dụng fit đường cong đáp ứng liều sigmoit hồi quy không tuyến tính Graphpad Prism (v. 4). Các kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình nhân $\pm$ sai số tiêu chuẩn; n = số lần xác định độc lập.

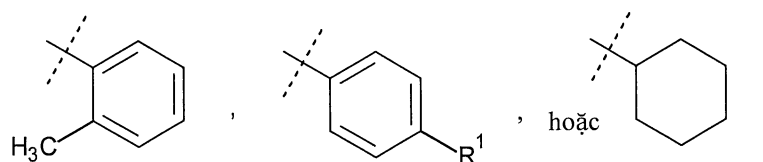
Theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, các hợp chất nêu trong các ví dụ từ 1 đến 9 ở đây được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả trên đây và thể hiện IC₅₀ nhỏ hơn khoảng 1 μ M. Cụ thể hơn là, theo sau các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, hợp chất nêu trong Ví dụ 1 có IC₅₀ bằng 123 $\pm$ 88 nM (n=12). Điều này chứng minh rằng các hợp chất nêu trong các ví dụ từ 1 đến 9 là các chất đối kháng EP4 hiệu nghiệm trong thử nghiệm cảm ứng TNF α ở máu của người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



trong đó X là:



R^1 là H, -CN, hoặc F;

R^2 là H hoặc metyl;

R^3 là H; và

R^4 là H, metyl, hoặc etyl; hoặc

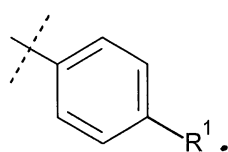
R^3 và R^4 kết hợp cùng với nhau tạo ra vòng xyclopropyl;

hoặc muối được dụng của nó.

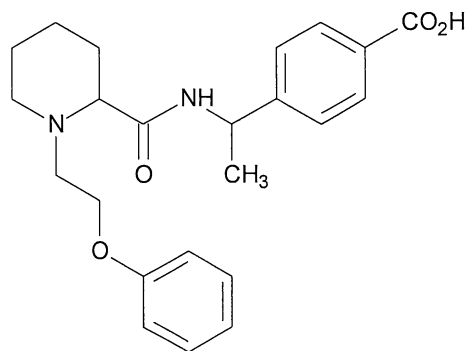
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R^2 là H.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R^3 là H và R^4 là metyl.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó X là:

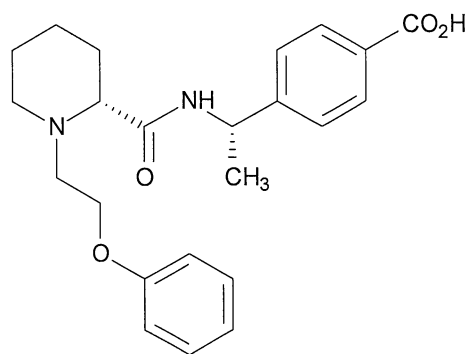


5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là:



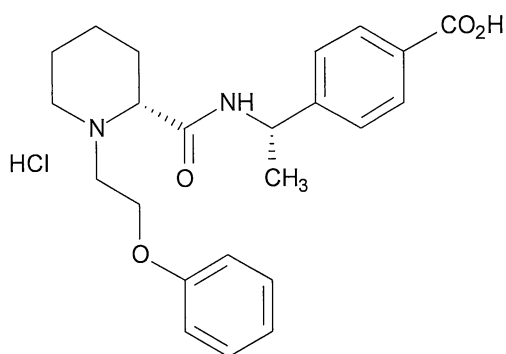
hoặc muối được dụng của nó.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó hợp chất này là:



hoặc muối được dụng của nó.

7. Muối hydroclorua của hợp chất theo điểm 6, trong đó muối này là:



8. Dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối được dụng của nó như được xác định ở điểm 6 kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

9. Dược phẩm chứa muối hydroclorua như được xác định ở điểm 7 kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.