(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) **1-0024694**

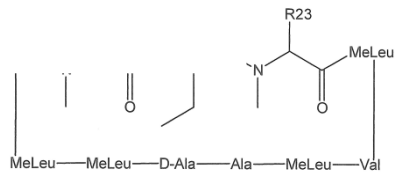
(51)[7] **C07K 7/64**; C07K 1/113; A61K 38/12; A61K 38/13

(13) **B**

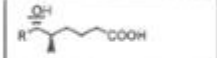
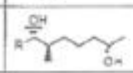
(21) 1-2013-02169
(22) 14/12/2011
(86) PCT/CA2011/050773 14/12/2011
(87) WO2012/079172 21/06/2012
(30) 61/423,576 15/12/2010 US
(45) 27/07/2020 388
(43) 25/09/2013 306A
(73) ContraVir Pharmaceuticals, Inc. (US)
399 Thornall Street, 1st Floor, Edison, New Jersey 08837, United States of America
(72) Alexander HEGMANS (CA); Bruce W. FENSKE (CA); Dan J. TREPANIER (CA); Mark D. ABEL (CA); Shin SUGIYAMA (CA); Darren R. URE (CA).
(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) HỢP CHẤT TƯƠNG TỰ XYCLOSPORIN ĐƯỢC CẢI BIẾN TẠI CÁC VỊ TRÍ AXIT AMIN 1 VÀ 3, VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất tương tự xyclosporin-A bao gồm sự cải biến của các phần tử thế ở các vị trí axit amin 1 và 3, theo công thức sau đây. Các hợp chất được bộc lộ gồm có các hợp chất có ái lực đối với xyclophilin-A, và làm giảm hoạt động ức chế miễn dịch so với xyclosporin-A và các chất tương tự của nó được cải biến chỉ ở vị trí 1. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình điều chế hợp chất này.



Bảng 5

	Sự cải biến	Cấu trúc đã cải biến-1		1 + 3-O-MeAla	
Tên h/c cải biến -1	Cấu trúc đã cải biến-1	Sự ức chế CyP A Số lần hiệu lực so với CsA	% ức chế miễn dịch so với CsA	Sự ức chế CyP A Số lần hiệu lực so với CsA	% ức chế miễn dịch so với CsA
404-58		0,16	< 1	1,3	< 1
420-171		2,3		8,7	< 1
420-19		3,7	< 1	9,5	3,4
416-08		1,7	< 1	14,3	3
404-98		2,2	6,5	15	7,6

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất tương tự của phân tử thuộc nhóm xyclosporin gồm có các chất tương tự xyclosporin A (xyclosporin A - CsA), và gồm các chất tương tự có hoạt tính giảm hoặc không ức chế miễn dịch và gắn kết với xyclophilin (xyclophilin - CyP).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Xyclosporin là thành viên thuộc nhóm polypeptit vòng có hoạt tính ức chế miễn dịch mạnh. Ít nhất một vài hợp chất trong số các hợp chất này, ví dụ xyclosporin A (CsA), do loài *Tolypocladium inflatum* sản sinh như là chất chuyển hóa thứ cấp. CsA là chất ức chế miễn dịch mạnh được chứng tỏ là ức chế khả năng miễn dịch thể dịch và các phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, ví dụ như sự thải bỏ dị ghép, quá mẫn chậm, bệnh viêm não-tủy do dị ứng thử nghiệm, bệnh viêm khớp do tá dược Freund và bệnh cơ thể chủ chống lại các mảnh ghép. Chất này được dùng để ngăn ngừa sự thải bỏ cơ quan sau khi cấy ghép cơ quan; để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp; và để điều trị bệnh vảy nến.

Mặc dù nhiều hợp chất của nhóm xyclosporin đã được biết, CsA có lẽ là hợp chất được sử dụng rộng rãi nhất trong y học. Tác dụng ức chế miễn dịch của CsA liên quan đến khả năng ức chế các chất hoạt hóa qua trung gian tế bào T. Khả năng ức chế miễn dịch này có được nhờ sự gắn kết xyclosporin với protein nội bào thường gặp được gọi là xyclophilin (CyP). Về phần mình, phức hợp này ức chế hoạt tính serin-threonin phosphataza phụ thuộc canxi và calmodulin của enzym canxinơrin. Việc ức chế canxinơrin ngăn ngừa sự hoạt hoá của các yếu tố sao chép như NFATp/c và NF-κB, các yếu tố này cần thiết để kích thích các gen xytokin (*IL-2, IFN-γ, IL-4, và GM-CSF*) trong quá trình hoạt hoá tế bào T.

Từ phát hiện ban đầu về xyclosporin, rất nhiều xyclosporin tự nhiên đã được phân lập và được xác định. Ngoài ra, rất nhiều xyclosporin không có trong tự nhiên khác nữa cũng đã được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp hoặc bán tổng hợp hoặc bằng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào cải biến. Nhóm xyclosporin hiện nay về cơ bản gồm có, ví dụ, các xyclosporin từ A đến Z có trong tự nhiên, các dẫn xuất xyclosporin không có trong tự nhiên khác nhau; các xyclosporin nhân tạo hoặc xyclosporin tổng hợp gồm có các đihyđro- và izo-xyclosporin; các dẫn xuất xyclosporin (ví dụ, trong đó nguyên tử O ở vị trí 3' của gốc MeBmt được axyl hoá hoặc một phần tử thế khác được đưa vào ở vị trí nguyên tử cacbon của gốc sarcosyl ở vị trí 3); các xyclosporin có gốc MeBmt ở dạng chất đồng phân (ví dụ, trong đó cấu hình ở vị trí 6' và 7' của gốc MeBmt ở dạng cis hơn là các dạng trans); và các xyclosporin có các axit amin khác nhau được đưa vào các vị trí cụ thể của chuỗi peptit.

Các chất tương tự xyclosporin chứa các axit amin được cải biến ở vị trí 1 đã được bộc lộ trong WO 99/18120 và WO 03/033527, các đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn với toàn bộ tính toàn vẹn của chúng. Các đơn này mô tả các dẫn xuất của xyclosporin A được biết là "ISATX247" hoặc "ISA247" hoặc "ISA". Chất tương tự này có cấu trúc giống với CsA, ngoại trừ được cải biến ở gốc axit amin tại vị trí 1. Người nộp đơn đã phát hiện ra rằng các hỗn hợp nhất định của chất đồng phân cis và trans của "ISA247", gồm các hỗn hợp chủ yếu chứa trans ISA247, kết hợp được khả năng ức chế miễn dịch cao và độc tính giảm so với các xyclosporin có trong tự nhiên và đã biết.

Xyclosporin có ba đích tế bào đã được định rõ; canxinơrin, các isoform CyP (bao gồm nhưng không giới hạn ở CyP-A, CyP-B và CyP-D), và P-glycoprotein (PgP). Sự gắn kết của xyclosporin với canxinơrin dẫn đến khả năng ức chế miễn dịch đáng kể và chịu trách nhiệm về sự liên quan truyền thống của nó với những dấu hiệu tự miễn dịch và cấy ghép.

Nhóm xyclophilin

Các CyP (Tiểu ban về Enzym (Enzyme Commission (EC)) số 5.1.2.8) thuộc nhóm protein có hoạt tính peptidyl-prolyl cis-trans isomeraza; các protein này được gọi chung là philin miễn dịch (immunophilin) và cũng bao gồm protein gắn kết FK-506 và parvulin. CyP được thấy ở tất cả các tế bào của các sinh vật được nghiên cứu, trong các nhóm Tiền hạch và sinh vật có nhân điển hình và được bảo toàn về cấu trúc trong quá trình tiến hóa. Có 7 loại CyP chính ở người, cụ thể là CyP-A, CyP-B, CyP-C, CyP-D, CyP-E, CyP-40, và CyP-NK (lần đầu tiên được nhận dạng từ các tế bào giết ở người), và tổng cộng có 16 protein đáng chú ý (Galat A. Peptidylprolyl *cis/trans* isomerases (immunophilins): biological diversity - targets - functions. *Curr Top Med Chem* 2003, 3:1315-1347; Waldmeier PC et al. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem* 2003, 10:1485-1506).

Thành viên đầu tiên của các CyP được nhận dạng ở động vật có vú là CyP-A. CyP-A là protein phần bào tan 18-kDa và là protein phổ biến nhất gắn kết với CsA. Ước tính CyP-A chiếm tới 0,6% tổng protein phần bào tan (Mikol V et al. X-ray structure of monmeric cyclophilin A-xycloporin A crystal complex at 2.1 A resolution. *J. Mol.Biol.* 1993, 234:1119–1130; Galat A, Metcalfe SM. Peptidylproline cis/trans isomerases. Prog. Biophys. *Mol. Biol.* 1995, 63:67–118).

Sự định vị của xyclophilin trong tế bào

Các CyP có thể thấy ở hầu hết ngăn tế bào của phần lớn các mô và mã hóa các chức năng đáng chú ý. Ở động vật có vú, CyP-A và CyP-40 là phần bào tan trong khi CyP-B và CyP-C có trình tự tín hiệu cuối amino, làm cho chúng là đích của quy trình chế tiết protein thể lưới nội chất (reviewed in Galat, 2003; Dornan J et al.Structures of immunophilins and their ligand complexes. *Curr Top Med Chem* 2003, 3:1392-1409). CyP-D có chuỗi tín hiệu điều khiển nó tới ty thể (Andreeva L et al. Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol,* 1999, 80:305-315; Hamilton GS et al. Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem* 1998, 41:5119-5143); CyP-E có vùng gắn kết ARN đầu cuối amino và nằm ở nhân (Mi H et al. A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett* 1996, 398:201-205) và

CyP-40 có các TPR và có ở phần bào tan (Kieffer LJ et al. Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA và further characterization. *J Biol Chem* 1993, 268:12303-12310). CyP-NK ở người là CyP lớn nhất, có đầu cuối cacboxyl lớn, ưa nước và dương tính, và ở phần bào tan (Anderson SK et al. A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:542-546; Rinfret A et al.The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidylprolyl *cis-trans*isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* 1994, 33:1668-1673).

Chức năng và hoạt tính của xyclophilin

CyP là protein đa chức năng tham gia vào nhiều quá trình của tế bào. Do CyP được bảo toàn tốt trong quá trình tiến hóa, điều này cho thấy vai trò thiết yếu của CyP. Ban đầu, nhận thấy rằng CyP có đặc tính enzym đặc hiệu xúc tác quá trình đồng phân hóa *cis-trans* của các liên kết peptidyl-prolyl (Galat, 1995; Fisher GA et al. A phase I study of paclitaxel (taxol) (T) in combination with SDZ valspodar, a potent modulator of multidrug resistance (MDR). *Anticancer Drugs.* 1994; 5(Suppl 1): 43). Do đó, CyP được gọi là isomeraza peptidyl-prolyl-cis-trans (PPIase), enzym này có tác dụng như là yếu tố thúc đẩy sự gấp nếp chính xác của protein mới được tổng hợp, PPIases cũng tham gia vào quá trình sửa chữa các protein bị tổn hại do stress môi trường như stress nhiệt, bức xạ cực tím, sự thay đổi độ pH của môi trường tế bào và sự xử lý bằng tác nhân oxi hóa. Chức năng này được biết là hoạt tính tạo ra chaperon phân tử. (Yao Q et al. Roles of Cyclophilins in Cancers and Other Organs Systems. *World J. Surg*. 2005, 29: 276–280)

Ngoài ra, gần đây hoạt tính PPIase của CyPs được chứng tỏ là có liên quan đến các quá trình khác nhau của tế bào, bao gồm quá trình di chuyển protein nội bào (Andreeva 1999; Caroni P et al. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J Biol Chem* 1991, 266:10739–42), chức năng của ty thể (Halestrap AP et al. CsA binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997, 174:167–72; Connern CP, Halestrap AP. Recruitment of mitochondrial

cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a canxi-sensitive non-specific channel. *Biochem J* 1994, 302:321–4), quá trình tiền-mRNA (Bourquin JP et al. A serine/arginineriche nuclear matrix cyclophilin interacts with the Cterminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* 1997, 25:2055–61), và việc duy trì độ ổn định của phức hợp đa protein (Andreeva, 1999).

Xyclosporin gắn kết bằng ái lực nanomol với CyP-A thông qua sự tiếp xúc trong túi kỵ nước (Colgan J et al. Cyclophilin A-Deficient Mice Are Resistant to Immunosuppression by Xyclosporin. *The Journal of Immunology* 2005, 174: 6030–6038, Mikol, 1993) và ức chế hoạt tính PPIase. Tuy nhiên, tác dụng này được cho là không liên quan đến khả năng ức chế miễn dịch. Đúng hơn, phức hợp của CsA và CyP-A tạo ra bề mặt composit gắn kết với canxinơrin và ngăn ngừa canxinơrin điều chỉnh sự phiên mã gen cytokin (Friedman J et al. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one at the presence and one in the absence of CsA. *Cell* 1991, 66: 799–806; Liu J et al. Canxinơrin is a common target of cyclophilin-CsA và FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991, 66: 807–815).

Tính tương đồng của xyclophilin

CyP-A, thành viên đầu tiên thuộc nhóm này, là protein được bảo toàn với mức cao ở tế bào của động vật có vú (Handschumacher RE et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for CsA. *Science* 1984, 226: 544–7). Việc nghiên cứu tính tương đồng trình tự của CyP-A ở người cho thấy nó có tính tương đồng ở mức cao với CyP-B, CyP-C, và CyP-D ở người (Harding MW, Handschumacher RE, Speicher DW. Isolation and axit amin sequence of cyclophilin. *J Biol Chem* 1986, 261:8547–55). Túi gắn kết xyclosporin của tất cả các CyPs được tạo ra do vùng được bảo toàn với mức cao của khoảng 109 axit amin. Trong số các CyP đã biết, CyP-D có tính tương đồng với mức cao nhất với CyP-A. Thực tế, trong vùng này tính tương đồng về trình tự giữa CyP-A và CyP-D là 100% (Waldmeier 2003; Kristal BS et al. The Mitochondrial Permeability Transition as a Target for Neuroprotection. *Journal of Bioenergetics và*

Biomembranes 2004, 36(4); 309-312). Do đó, ái lực CyP-A là yếu tố dự báo rất tốt về ái lực CyP-D, và ngược lại (Hansson MJ et al. The Nonimmunosuppressive Xyclosporin analogues NIM811 and UNIL025 Display Nanomolar Potencies on Permeability Transition in Brain-Derived Mitochondria. *Journal of Bioenergetics và Biomembranes,* 2004, 36(4): 407-413). Mối liên hệ này đã được chứng minh nhiều lần theo kinh nghiệm với các chất tương tự xyclosporin (Hansson, 2004; Ptak Rg et al. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Human Cells by Debio-025, a Novel Cyclophilin Binding Agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008: 1302–1317; Millay DP et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nature Medicine* 2008, 14(4): 442-447; Harris R et al. The Discovery of Novel Non-Immunosuppressive Xyclosporin Ethers and Thioethers With Potent HCV Activity. Poster # 1915, *59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD),* 2008). Tính tương đồng về trình tự của CyP gợi ý rằng tất cả các CyP là đích tiềm năng của các chất tương tự xyclosporin. Do có rất nhiều quá trình của tế bào mà trong đó CyP tham gia, điều này còn gợi ý rằng các chất tương tự CsA giữ được sự gắn kết đáng kể với CyP có thể được sử dụng để điều trị nhiều triệu chứng bệnh.

Các bệnh qua trung gian xyclophilin

Virut gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV):

HIV là một lentivirut thuộc nhóm retrovirut và là một ví dụ về sự liên quan của CyP vào quá trình lây nhiễm và sao chép của một số virut nhất định. CyP-A đã được xác lập từ hơn một thập niên trước là đích có hiệu lực trong hoá học trị liệu chống HIV (Rosenwirth BA et al. Cyclophilin A as a novel target in anti-HIV-1 chemotherapy. *Int. Antivir. News* 1995, 3:62–63). CyP-A thực hiện chức năng thiết yếu vào giai đoạn đầu của chu trình sao chép HIV-1. Nó được nhận thấy là gắn kết đặc hiệu với polyprotein HIV-1 Gag (Luban JKL et al. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A và B. *Cell* 1993, 73: 1067–1078). Trình tự axit amin được xác định quanh G89 và P90 của capsid protein p24 (CA) được xác định là vị trí

gắn kết của CyP-A (Bukovsky AAA et al. Transfer of the HIV-1 cyclophilin-binding site to simian immunodeficiency virus from Macaca mulatta can confer both xyclosporin sensitivity and xyclosporin dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 10943–10948; Gamble TRF et al. Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* 1996, 87: 1285–1294). Ái lực của CyP-A với CA thúc đẩy sự hợp nhất của CyP-A vào các hạt virion trong quá trình lắp ráp (Thali MA et al. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 1994, 372: 363–365). Bằng chứng thử nghiệm cho thấy sự tương tác giữa CyP-A-CA là cần thiết cho quá trình sao chép của HIV-1; việc ức chế sự tương tác này phá huỷ quá trình sao chép HIV-1 ở các tế bào của người (Hatziioannou TD et al. Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J. Virol.* 2005, 79: 176–183; Steinkasserer AR et al. Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive CsA analog with activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): interference with early and late events in HIV-1 replication. *J. Virol* 1995, 69: 814–824). Giai đoạn mà CyP-A tham gia vào quá trình sao chép của virut được chứng tỏ là một khả năng có thể xảy ra sau sự xâm nhập của hạt virut và trước sự kết hợp của ADN sợi đôi của virut vào bộ gen của tế bào (Braaten DEK et al. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J. Virol* 1996 70: 3551–3560;mLynar ED et al. The non-immunosuppressive CsA analogue SDZ NIM 811 inhibits cyclophilin A incorporation into virions and virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected primary and growth-arrested T cells. *J. Gen. Virol* 1996, 78: 825–835; Steinkasserer, 1995). Năm 1988, hoạt tính kháng HIV-1 của CsA lần đầu tiên được báo cáo (Wainberg MA et al. The effect of CsA on infection of susceptible cells by human immunodeficiency virus type 1. *Blood* 1998, 72: 1904–1910). Việc đánh giá CsA và nhiều dẫn xuất ức chế sự sao chép của HIV-1 cho thấy các chất tương tự CsA không ức chế miễn dịch có hoạt tính kháng HIV-1 ngang bằng hoặc thậm chí cao hơn so với hoạt tính của các chất tương tự ức chế miễn dịch (Bartz SRE et al. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by nonimmunosuppressive analogs of CsA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 5381–5385; Billich AF et al. Mode of action of

SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive CsA analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J. Virol* 1995, 69: 2451–2461; Ptak, 2008).

Chứng viêm

Chứng viêm trong các bệnh liên quan đến sự tấn công của bạch cầu (tế bào máu trắng) vào vùng bị nhiễm trùng. Bạch cầu được lôi kéo vào vùng này bởi chemokine, là nhóm chất hút thu hoá học. Nghiên cứu *in vitro* đã chứng tỏ CyP-A ngoại bào là chất hút thu hoá học mạnh đối với tế bào T và bạch cầu ở người (Kamalpreet A et al. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses *Journal of Immunology* 2005; 175: 517–522; Yurchenko VG et al. Active-site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 22959–22965; Xu QMC et al. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 11968–11971; Allain FC et al. Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 2714–2719). Hơn nữa, CyP-A có thể gây phản ứng viêm nhanh, đặc trưng bởi sự tấn công của bạch cầu, khi được tiêm truyền *in vivo* (Sherry BN et al. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 3511–3515). CyP-A có mặt ở khắp nơi trong tế bào, tuy nhiên trong suốt quá trình phản ứng viêm, CyP-A được giải phóng vào các khoảng trống của mô ngoại bào bởi cả các tế bào sống và đang chết (Sherry, 1992). Thực tế, nồng độ CyP-A gia tăng đã được báo cáo ở nhiều bệnh viêm khác nhau, bao gồm bệnh nhiễm trùng, chứng viêm khớp thấp và bệnh tế bào cơ trơn của mạch (Jin ZG et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ. Res.* 2000; 87: 789–796; Teger, 1997; Billich, 1997). Trong trường hợp chứng viêm khớp thấp, sự tương liên trực tiếp giữa nồng độ CyP-A và số lượng bạch cầu trung tính trong hoạt dịch của bệnh nhân bị viêm khớp thấp đã được báo cáo (Billich, 1997).

Bệnh ung thư

Gần đây, CyP-A được chứng tỏ là biểu hiện quá mức ở nhiều dòng tế bào và mô ung thư, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư bàng quang, ung thư tế bào gan, ung thư tuyến tụy và ung thư vú (Li, 2006; Yang H et al. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 361: 763–767; Campa, 2003). Trong trường hợp CyP-A ngoại sinh được cung cấp, chúng được chứng tỏ là kích thích sự tăng trưởng của tế bào ung thư (Li, 2006; Yang, 2007) trong khi CsA làm ngừng sự tăng trưởng (Campa, 2003). Gần đây nhất, CyP (A và B) đã được chứng tỏ là tham gia một cách phức tạp vào quá trình sinh hoá làm tăng trưởng tế bào ung thư vú ở người và các thử nghiệm bất hoạt CyP đã làm giảm sự tăng trưởng, sự tăng sinh và khả năng vận động của tế bào ung thư (Fang F et al. The expression of Cyclophilin B is Associated with Malignant Progression and Regulation of Genes Implicated in the Pathogenesis of Breast Cancer. *The American Journal of Pathology* 2009; 174(1): 297-308; Zheng J et al. Prolyl Isomerase Cyclophilin A Regulation of Janus-Activated Kinase 2 and the Progression of Human Breast Cancer. *Cancer Research* 2008; 68 (19): 7769-7778). Thú vị nhất là, việc xử lý CsA cho chuột được dị ghép với tế bào ung thư vú đã gây ra sự chết hoại khối u và ức chế hoàn toàn sự di căn (Zheng, 2008). Các nhà nghiên cứu kết luận rằng "hoạt tính của xyclophilin B có thể góp phần lớn vào sự phát sinh bệnh ung thư vú ở người" và "sự ức chế xyclophilin có thể là một chiến lược điều trị mới để điều trị bệnh ung thư vú ở người" (Fang, 2009; Zheng, 2008).

Bệnh viêm gan C

Virut viêm gan C (Hepatitis C Virus (HCV)) là bệnh gan phổ biến nhất trên thế giới và được Tổ chức Y tế Thế giới xem là một bệnh dịch. Do HCV có thể lây nhiễm cho bệnh nhân hàng thập niên trước khi được phát hiện, bệnh này thường được gọi là bệnh dịch "thầm lặng". Các nghiên cứu cho rằng hơn 200 triệu người trên thế giới bị nhiễm HCV, tổng tỷ lệ mắc bệnh chiếm khoảng 3,3% dân số thế giới. Chỉ riêng ở Mỹ, gần 4 triệu người bị hoặc bị nhiễm HCV và trong số này 2,7 triệu người đang bị nhiễm bệnh mạn tính. Tất cả những người bị nhiễm HCV có nguy cơ phát triển bệnh gan nghiêm trọng đe dọa đến cuộc sống. Liệu pháp chuẩn hiện thời điều trị viêm gan C

mạn tính là kết hợp interferon pegyl hoá phối hợp với ribavirin, cả hai chất này đều là chất kháng virut tổng quát (Craxi A et al. Clinical trial results of peginterferons in combination with ribavirin. *Semin Liver Dis* 2003; 23(Suppl 1): 35-46). Tỷ lệ không chữa được là khoảng 50 % (Molino BF. Strategic Research Institute: 3rd annual viral hepatitis in drug discovery and development world summit 2007. *AMRI Technical Reports*; 12(1)).

Mới đây, CyP-B được chứng tỏ là cần thiết cho quá trình sao chép bộ gen HCV một cách hiệu quả (Watashi K et al. Cyclophilin B is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase. Molecular Cell 2005, 19: 111–122). Các virut này phụ thuộc vào các yếu tố của chủ thể như CyP-B cho quá trình sao chép bộ gen của chúng một cách hiệu quả. CyP-B tương tác với HCV RNA polymeraza NS5B để kích thích trực tiếp hoạt tính gắn kết ARN của nó. Cả sự giảm biểu hiện CyP-B qua trung gian nhiễu ARN (ARNi) và sự mất cảm ứng gắn kết NS5B với CyP-B đều làm giảm mức độ sao chép của HCV. Do đó, CyP-B hoạt động như là yếu tố điều chỉnh kích thích NS5B trong bộ máy sao chép của HCV. Cơ chế điều chỉnh quá trình sao chép này xác định CyP-B như là đích của các chiến lược điều trị kháng virut.

Không giống như các liệu pháp điều trị HCV khác, sự ức chế CyP không tác động trực tiếp đến virut HCV. Do đó được cho rằng khả năng kháng thuốc gắn kết CyP sẽ diễn ra chậm hơn so với thuốc điều trị HCV hiện nay (Manns MP, et al. The way forward in HCV treatment- finding the right path. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6: 991-1000). Ngoài ra, bằng cách can thiệp vào mức độ tương tác virut-chủ thể, việc ức chế CyP có thể mở đường cho phương pháp mới điều trị kháng HCV, phương pháp này có thể bổ sung, không chỉ cho việc điều trị bằng interferon, mà còn cho các liệu pháp điều trị tác động trực tiếp đến enzym sao chép HCV như các chất ức chế, ví dụ, proteaza và polymeraza trong tương lai (Flisiak R, Dumont JM, Crabbé R. Cyclophilin inhibitors in hepatitis C viral infection. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2007, 16(9): 1345-1354). Sự phát triển các thuốc kháng HCV mới tác động đến sự sao chép của virut HCV đã bị cản trở nhiều do không có mô hình HCV phù hợp cho phòng thí nghiệm. Trở ngại này chỉ mới được khắc phục gần đây nhờ sự phát triển của nhiều mô hình nuôi cấy tế bào phù hợp (các hệ thống sao chép bộ gen phụ HCV –

(Subgenomic HCV Replicon Systems)) và mô hình chuột chứa tế bào gan người (Goto K, et al. Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, CsA, and NIM811. *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 343: 879–884; Mercer DF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7: 927-933). Mới đây, xyclosporin được chứng tỏ là có hoạt tính kháng HCV ở các mô hình sàng lọc và ở các thử nghiệm lâm sàng nhỏ (Watashi K, et al. CsA suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003; 38:1282-1288; Inoue K, Yoshiba M. Interferon combined with cyclosporin treatment as an effective countermeasure against hepatitis C virus recurrence in liver transplant patients with end-stage hepatitis C virus related disease. *Transplant Proc* 2005; 37:1233-1234).

Các rối loạn thoái hóa cơ

CyP-D là phần không thể thiếu của lỗ chuyển tiếp tính thấm của ty thể (mitochondrial permeability transition pore (MTP)) ở tất cả các tế bào. Chức năng của lỗ MTP là tạo ra sự cân bằng nội tại canxi trong tế bào. Trong điều kiện bình thường quá trình mở và đóng của lỗ MTP là quá trình thuận nghịch. Trong điều kiện bệnh lý liên quan đến dòng canxi vào tế bào quá mức, làm cho ty thể quá tải và làm cho lỗ MPT mở không đóng lại được, dẫn đến việc tế bào bị chết hoặc sự tự chết được định trước của tế bào. CsA được báo cáo là điều chỉnh sự rối loạn chức năng của ty thể và sự tự chết được định trước của tế bào cơ ở bệnh nhân bị loạn dưỡng cơ bẩm sinh Ullrich và bệnh cơ Bethlam [(Merlini L et al. CsA corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *PNAS* 2008; 105(13): 5225-5229]. CsA được chứng tỏ *in vitro* là ức chế quá trình mở MTP phụ thuộc liều ở ty thể ở tim được phân lập, do đó ngăn ngừa sự tự chết được định trước và tạo ra cho tế bào thời gian quý giá để sửa chữa (Gomez L et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute mmmmyocardial infarction in mice *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 293: H1654–H1661). Một nghiêm cứu lâm sàng trên 58 bệnh nhân bị nhồi máu cơ tim cấp tính cho thấy việc sử dụng CsA vào thời điểm tái tưới máu có liên quan đến chứng nhồi máu nhỏ hơn là được nhận thấy với giả dược (Piot C et al. Effect of Cyclosporin

on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* 2008; 395(5): 474-481)).

Các bệnh thoái hóa thần kinh mạn tính

CsA có thể tác dụng như là chất bảo vệ thần kinh trong các trường hợp tổn thương và thiếu máu cục bộ ở não cấp tính, như là hậu quả của chấn thương đầu (Keep M, et al. Intrathecal xyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Research* 2001; 894: 327–331). Động vật được xử lý với CsA cho thấy có tỷ lệ sống sót cao 80% so với tỷ lệ sống sót chỉ bằng 10% khi không được xử lý. Về sau đã xác lập được rằng điều này chủ yếu là do kết quả của sự gắn kết của CsA với CyP-D ty thể. Theo đó, đã xác lập được rằng việc sử dụng CsA mở rộng đến quá trình thoái hóa thần kinh mạn tính, như được chứng tỏ trên mô hình chuột bị bệnh Lou Gerhig (US Patent No. 5,972,924), trong đó việc điều trị bằng CsA làm gia tăng hơn gấp đôi tuổi thọ còn lại. Gần đây, cũng nhận thấy rằng sự bất hoạt CyP-D ở chuột bị bất hoạt CyP-D bảo vệ các sợi trục thần kinh ở bệnh viêm não và dây cột sống tự miễn thử nghiệm, mô hình bệnh xơ cứng rải rác của động vật (Forte M et al. Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *PNAS* 2007; 104(18): 7558–7563). Trên mô hình chuột bị bệnh Alzheimer, sự suy giảm CyP-D cải thiện cơ bản khả năng học hỏi và trí nhớ và chức năng của si náp (Du H et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease *Nature Medicine* 2008, 14(10): 1097-1105). Ngoài ra, CsA được chứng tỏ có hiệu lực trên mô hình chuột bị bệnh Huntington (Leventhal L et al. CsA protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity. *Journal of Comparative Neurology* 2000, 425(4): 471-478), và có hiệu lực một phần trên mô hình chuột bị bệnh Parkinson (Matsuura K et al. CsA attenuates degeneration of dopaminrgic neurons induced by 6-hyđroxydopamin in the mouse brain. *Brain Research* 1996, 733(1): 101-104). Do đó, sự chết hoại phụ thuộc ty thể thể hiện cơ chế bệnh nổi bật - gợi ý rằng việc ức chế CyP-D có thể tạo ra chiến lược điều trị dược lý mới để điều trị các bệnh này (Du, 2008).

Tổn thương tế bào, mô và cơ quan do mất nội cân bằng ion canxi (Ca^{2+}) tế bào

Ca^{2+} tham gia vào nhiều quá trình sinh lý ở mức tế bào, bao gồm chức năng ty thể lành mạnh. Trong các điều kiện bệnh lý nào đó, ví dụ chứng nhồi máu cơ tim, đột quỵ, tính độc hại gan cấp tính, ứ mật, và tổn thương trữ/tái tưới máu ở cơ quan cấy ghép, ty thể mất khả năng điều chỉnh nồng độ canxi, và sự tích lũy canxi quá mức trong cơ chất ty thể dẫn đến sự mở các lỗ lớn trong nội màng ty thể (Rasola A. et al. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007, 12: 815-833.). Độ dẫn không chọn lọc của ion và phân tử cho đến 1,5 kilodalton qua lỗ, là quá trình được gọi là chuyển tiếp tính thấm ty thể, dẫn đến sự trương ty thể và các quá trình khác, cực điểm dẫn đến sự chết của tế bào, kể cả việc gây ra sự chết được định trước của tế bào. Một trong số các thành phần của MTP là CyP-D. CyP-D là phân tử philin miễn dịch mà hoạt tính isomeraza của nó điều chỉnh quá trình mở MPTP, và sự ức chế hoạt tính isomeraza bởi CsA hoặc chất tương tự CsA sẽ ức chế sự tạo thành MPTP, và do đó ngăn ngừa sự chết của tế bào.

Các chất ức chế xyclophilin tương tự xyclosporin không ức chế miễn dịch

Mặc dù có các tác dụng có lợi của CsA trong các chỉ dẫn nêu trên, các tác dụng ức chế miễn dịch đồng thời hạn chế việc sử dụng CsA làm chất ức chế CyP trong thực tiễn lâm sàng. Hiện nay, chỉ có một vài chất tương tự CsA được chứng tỏ có hoạt tính ức chế miễn dịch giảm hoặc không đáng kể (có nghĩa là <10% hoạt lực ức chế miễn dịch của CsA) và vẫn duy trì ái lực gắn kết với CyP (có nghĩa là >10% khả năng gắn kết với CyP so với CsA).

NIM 811 ($MeIle^4$-xyclosporin)

NIM 811 là sản phẩm lên men của *Tolypocladium niveum*, được cải biến tại axit amin 4 và không thể hiện hoạt tính ức chế miễn dịch (do không gắn kết với canxinơrin) song vẫn duy trì ái lực gắn kết với CyP-A (Rosenwirth BA et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive Xyclosporin Analogue. *Antimicrob Agents Chemother* 1994, 38: 1763–1772).

DEBIO 025 (MeAla^{3}EtVal^4-Xyclosporin)

DEBIO 025 là sự cải biến hoá học kép của CsA tại các axit amin 3 và 4. DEBIO 025 cũng không biểu hiện hoạt tính ức chế miễn dịch song vẫn duy trì ái lực gắn kết với hoạt tính của CyP-A PPIaza (Kristal, 2004).

SCY-635 (DimetylaminoetylthioSar^3-hydroxyLeu^4-Xyclosporin)

SCY-635 là sự cải biến hoá học kép của CsA tại các axit amin 3 và 4. SCY-635 cũng không biểu hiện hoạt tính ức chế miễn dịch song vẫn duy trì ái lực gắn kết với hoạt tính của CyP-A PPIaza (Công bố đơn quốc tế số WO2006/039668).

Nhìn chung, các hợp chất này tạo ra sự cải biến bề mặt của CsA, chịu trách nhiệm gắn kết canxinorin, và thường cần sự cải biến tại các axit amin 3 và 4. Quy trình cải biến của các axit amin 3 và 4 khó khăn và phức tạp, do quy trình này thường liên quan đến việc mở vòng xyclosporin, thay thế và/hoặc cải biến các axit amin này và sau đó đóng vòng để tạo ra xyclosporin cải biến.

Ngược lại, quy trình cải biến mạch nhánh của axit amin 1 không cần mở vòng xyclosporin. Tuy nhiên, axit amin 1 liên quan đến sự gắn kết với CyP (trái với sự gắn kết với xyclosporin) và được cải biến để làm tăng hiệu quả ức chế miễn dịch của CsA. Ví dụ, patent Mỹ số 6,605,593 bộc lộ một quy trình cải biến axit amin 1 duy nhất dẫn đến sự tạo thành chất tương tự CsA có hiệu lực úc chế miễn dịch gia tăng.

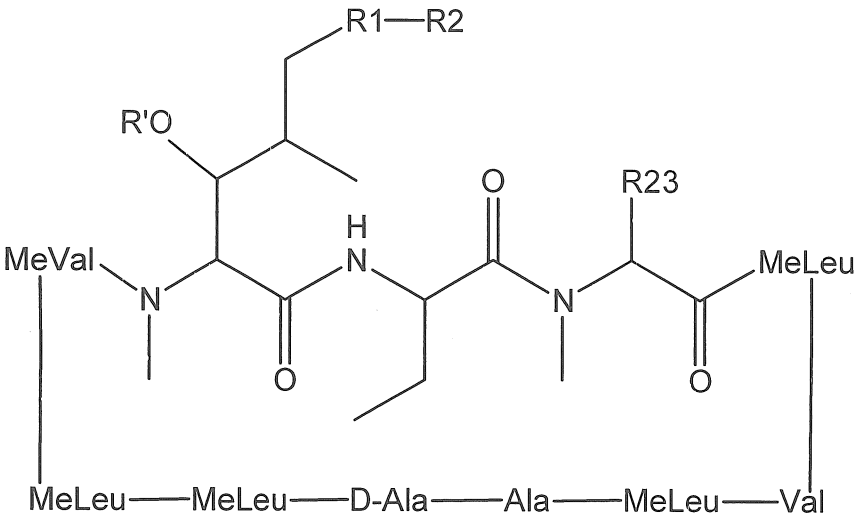
Do đó, việc có được phân tử của chất tương tự xyclosporin ("CAM") dễ dàng tổng hợp và có hiệu quả điều trị các bệnh qua trung gian CyP là được mong muốn. Người ta cũng mong muốn đưa ra một chất tương tự CsA cung cấp ít nhất một vài chức năng của CsA tự nhiên, nhưng nó sở hữu các tính chất, tác dụng và chức năng được cải thiện hoặc bổ sung so với CsA tự nhiên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, các hợp chất của sáng chế bao gồm các chất tương tự xyclosporin-A không ức chế miễn dịch theo định nghĩa trong tài liệu này. Theo một khía cạnh khác, các hợp chất có ái lực với xyclophilin, bao gồm cả xyclophilin-A.

Theo những khía cạnh khác, các hợp chất của sáng chế bao gồm các chất tương tự xyclosporin-A hữu dụng đối với bệnh hoặc tình trạng bệnh qua trung gian xyclophilin và phát triển các liệu pháp có liên quan tới các bệnh và tình trạng bệnh này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức L:



Công thức L

trong đó

a. R' là H hoặc axetyl;

b. R1 là mạch cacbon béo, thẳng hoặc nhánh, bão hoà hoặc không bão hoà, chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon; và

c. R2 được chọn từ nhóm gồm:

(i) H;

(ii) amit không được thế, được thế N, hoặc được thế hai lần N,N;

(iii) amin được bảo vệ axyl, thế N hoặc không được thế;

(iv) axit cacboxylic;

(v) amin thế N hoặc không được thế;

(vi) nitril;

(vii) este;

(viii) keton;

(ix) hyđroxy, đihyđroxy, trihyđroxy, hoặc polyhyđroxy alkyl; và

(x) aryl được thế hoặc không được thế;

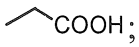
(xi) mạch béo thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa tùy ý chứa một phần tử thế được chọn từ nhóm gồm có hyđro, keton, hyđroxyl, nitril, axit cacboxylic, este, 1,3-đioxolan, halogen, và oxo;

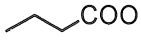
(xii) nhóm thơm chứa một phần tử thế được chọn từ nhóm gồm có halogenua, este và nitro; và

(xiii) hỗn hợp của mạch béo thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa ở mục (xi) và nhóm thơm ở mục (xii); và

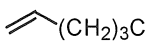
d. R23 là mạch cacbon béo được thế tùy ý, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa.

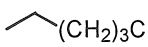
Trong một khía cạnh, phần tử thế R1 - R2 được chọn từ nhóm gồm có:

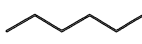
i.  ;

ii.  ;

iii. ;

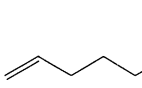
iv.  ;

v.  ;

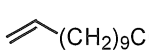
vi.  ;

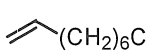
vii. ;

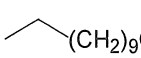
viii. ;

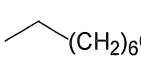
ix.  ;

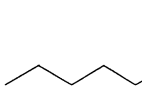
x. ;

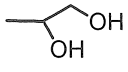
xi.  ;

xii.  ;

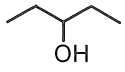
xiii.  ;

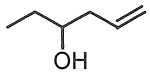
xiv.  ;

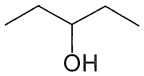
xv.  ;

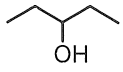
xvi.  ;

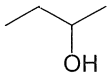
xvii. ;

xviii.  ;

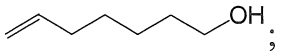
xix.  ;

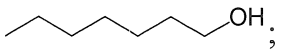
xx.  ;

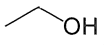
xxi.  ;

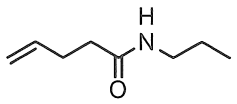
xxii.  ;

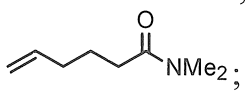
xxiii. ;

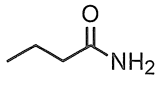
xxiv.  ;

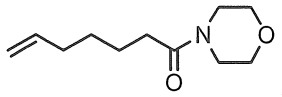
xxv.  ;

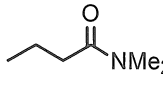
xxvi.  ;

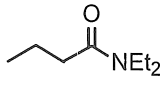
xxvii.  ;

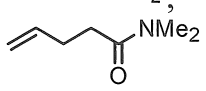
xxviii.  ;

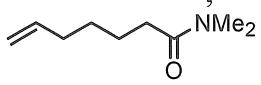
xxix.  ;

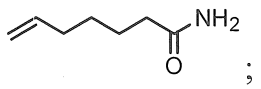
xxx.  ;

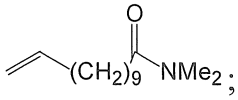
xxxi.  ;

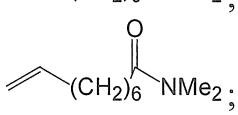
xxxii.  ;

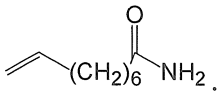
xxxiii.  ;

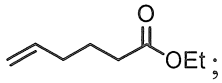
xxxiv.  ;

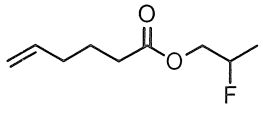
xxxv.  ;

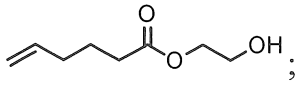
xxxvi.  ;

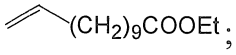
xxxvii.  ;

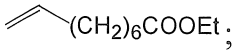
xxxviii.  .

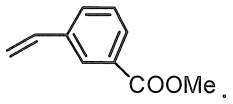
xxxix.  ;

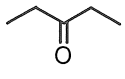
xl.  ;

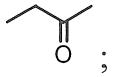
xli.  ;

xlii.  ;

xliii.  ;

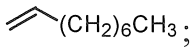
xliv.  .

xlv.  ;

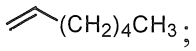
xlvi.  ;

xlvii. ;

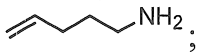
xlviii. ;

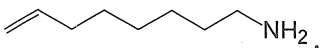
xlix.  ;

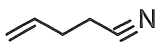
l. ;

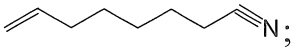
li.  ;

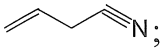
lii. ;

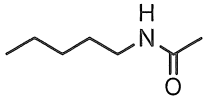
liii.  ;

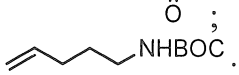
liv.  .

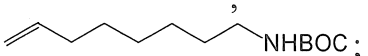
lv.  ;

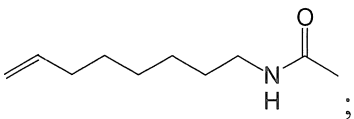
lvi.  ;

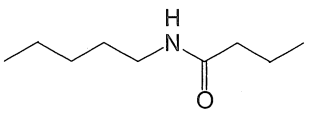
lvii.  ;

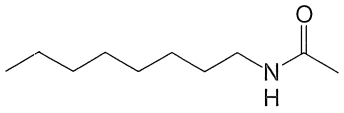
lviii.  ;

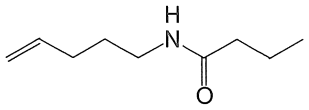
lix.  ;

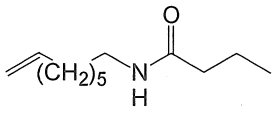
lx.  ;

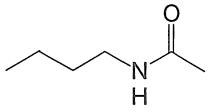
lxi.  ;

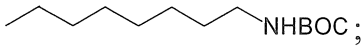
lxii.  ;

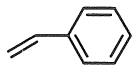
lxiii.  ;

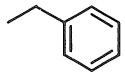
lxiv.  ;

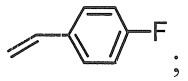
lxv.  ;

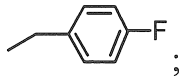
lxvi.  ;

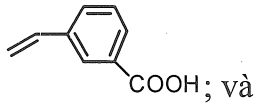
lxvii.  ;

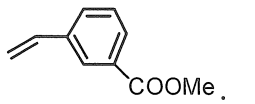
lxviii.  ;

lxix.  ;

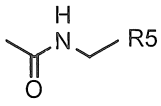
lxx.  ;

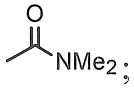
lxxi.  ;

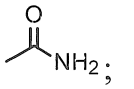
lxxii.  ; và

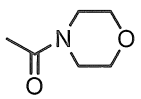
lxxiii.  .

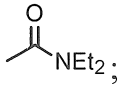
Trong một khía cạnh khác, R2 được chọn từ nhóm gồm có

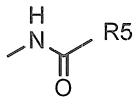
a. 

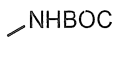
b.  ;

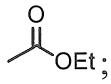
c.  ;

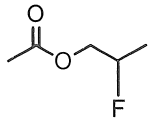
d.  ;

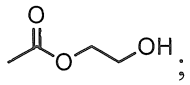
e.  ;

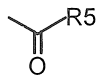
f. 

g.  ;

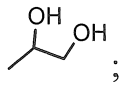
h.  ;

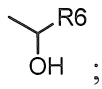
i.  ;

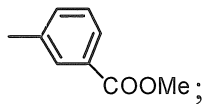
j.  ;

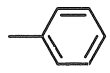
k.  ;

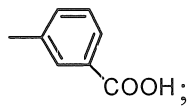
l. ;

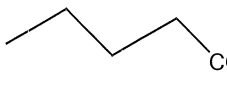
m.  ;

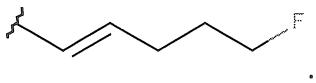
n.  ;

o.  ;

p.  ;

q.  ;

r.  ; và

s.  .

trong đó:

i. R5 là mạch cacbon béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, chứa từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon; và

ii. R6 là mạch cacbon béo chứa từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, được monohyđroxyl hóa, đihyđroxyl hóa, trihyđroxyl hóa hoặc polyhyđroxyl hóa.

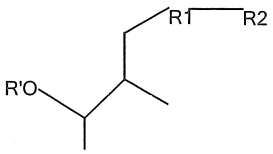
Trong một khía cạnh, R1-R2 bao gồm mạch cacbon béo chứa từ 2 đến 5 nguyên tử cacbon, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, được thế tùy ý bằng một phần tử thế được chọn từ nhóm gồm có hyđro, keton, hyđroxyl, nitril, halogen, oxo, axit cacboxylic, este và 1,3-đioxolan;

Trong một khía cạnh, R23 được chọn từ nhóm gồm có:

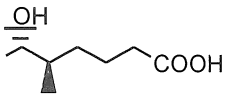
i.	$-CH_3$
ii.	$-CH_2CH_3$
iii.	$-CH_2CHCH_2$
iv.	$-CH_2CH_2CH_2I$
v.	$-(CH_2)_3CH_2I$
vi.	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$
vii.	$-CH_2CCH$
viii.	$-CH_2CO_2(t\text{-}Bu)$
ix.	$-CH_2Ph$
x.	$-CH_2OH$
xi.	$-CH(OH)CH_3$
xii.	$-CH(OH)(t\text{-}Bu)$
xiii.	$-CH(OH)Ph$
xiv.	$-COOH$
xv.	$-SCH_3$
xvi.	$-S(p\text{-}Tol)$

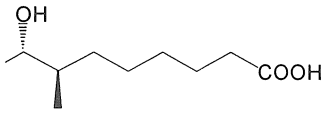
Trong một khía cạnh, R23 bao gồm một alkyl được thế tùy ý, bao gồm cả alkyl C1-C3 được thế tùy ý. Alkyl này có thể được thế bằng nhóm amin và có thể bao gồm C1-C3-Ala trong đó hợp chất này bao gồm D-epime. Trong phương án này, R23 có thể là MeAla.

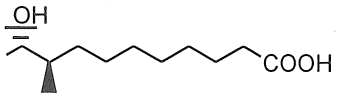
Trong một khía cạnh, ở công thức L nêu trên,

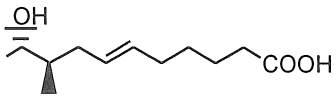


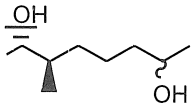
được chọn từ nhóm gồm có:

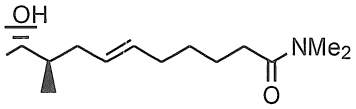


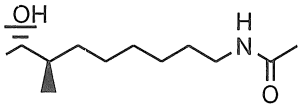


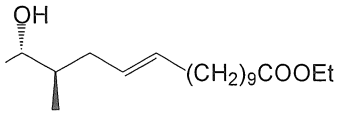


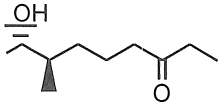


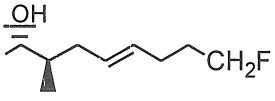




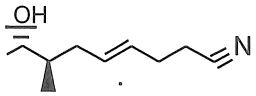








và



Trong một khía cạnh, R23 là mạch cacbon béo, thẳng hoặc nhánh, chứa từ 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3 hoặc 2 nguyên tử cacbon.

Trong một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh qua trung gian xyclophilin ở động vật có vú bao gồm việc cho động vật có vú dùng hợp chất như được mô tả trong tài liệu này dưới các điều kiện để điều trị bệnh hoặc tổn thương qua trung gian xyclophilin, hoặc sử dụng hợp chất hoặc thành phần nói trên để điều trị bệnh hoặc tổn thương nói trên, hoặc sử dụng hợp chất để điều chế thuốc để sử dụng hoặc điều trị như đã nói trên. Bệnh hoặc tổn thương nói trên có thể được trung gian bởi sự biểu hiện quá mức của xyclophilin hoặc bệnh này là một biểu hiện quá mức bẩm sinh của xyclophillin. Bệnh hoặc tổn thương qua trung gian xyclophilin nói trên có thể được chọn từ nhóm gồm có:

a. bệnh nhiễm trùng do virut
b. bệnh viêm;
c. ung thư;
d. rối loạn cơ;
e. rối loạn hệ thần kinh; và
f. tổn thương liên quan đến chứng thiếu máu cục bộ, sự tái tưới máu, mất nội cân bằng canxi tế bào, mất cân bằng ion nội môi, giai tăng sản xuất các gốc tự do, hoặc các độc tố gây rối loạn chức năng ty lạp thể;

trong đó nhiễm trùng do virut tùy ý được gây ra bởi virut được chọn từ nhóm gồm có virut suy giảm miễn dịch ở người, viêm gan A, viêm gan B, viêm gan C, viêm gan D, viêm gan E, SARS-CoV, hCoV-NL63,

hCoV-HKU-1, hCoV-OC43, hCOV-229E, coronavirus, virut viêm phúc mạc lây nhiễm từ mèo, và virut viêm dạ dày ruột có thể truyền nhiễm;

trong đó bệnh viêm nhiễm tùy ý được chọn từ nhóm gồm có bệnh hen, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm mạn tính, bệnh viêm tuyến tiền liệt mạn tính, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh tăng cảm, bệnh viêm đường ruột, bệnh nhiễm khuẩn huyết, bệnh tế bào cơ trơn của thành mạch, bệnh phình mạch, bệnh viêm vùng chậu, tổn thương tái tưới máu, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, chứng thải bỏ mảnh ghép, và chứng viêm mạch;

trong đó bệnh ung thư tùy ý được chọn từ nhóm gồm có ung thư phổi tế bào nhỏ và không phải tế bào nhỏ, ung thư bàng quang, ung thư tế bào gan, ung thư tuyến tụy, ung thư vú, u nguyên bào đệm, ung thư kết tràng, ung thư biểu mô tế bào vảy, u ác tính, và ung thư tuyến tiền liệt;

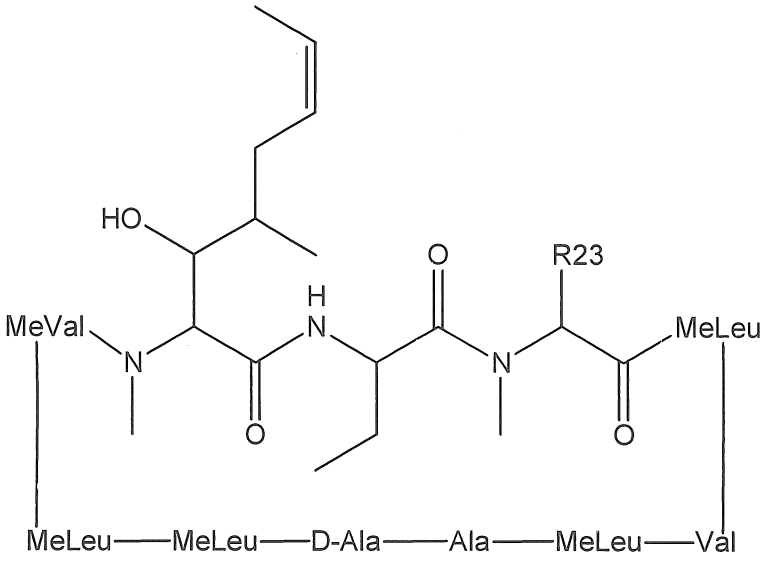
trong đó rối loạn cơ bắp được chọn từ nhóm gồm có tổn thương tái tưới máu cơ tim, chứng loạn dưỡng cơ (bệnh teo cơ), các bệnh cơ liên quan đến collagen VI, hội chứng sau ngưng tim (PCAS), suy tim, xơ vữa động mạch, và phình động mạch chủ bụng;

trong đó rối loạn hệ thần kinh tùy ý được chọn từ nhóm gồm có bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, teo nhiều hệ thống, bệnh đa xơ cứng, liệt não, động kinh, đột quỵ, bệnh thần kinh đái tháo đường, xơ cứng teo cơ cột bên (bệnh Lou Gehrig), rối loạn lưỡng cực, tổn thương do exitotoxin, bệnh não do gan, hạ đường huyết, nhiễm độc mangan, thiếu hụt đích tế bào thần kinh, các axit béo độc hại như là axit arachađonic, tổn thương thần kinh cơ, tổn thương tủy sống, và tổn thương não; và

trong đó tổn thương liên quan đến sự mất nội cân bằng canxi tế bào tùy ý được chọn từ nhóm gồm có nhồi máu cơ tim, đột quỵ, nhiễm độc gan cấp tính, ứ mật, và tổn thương lưu trữ/tái tưới máu của các cơ quan cấy ghép.

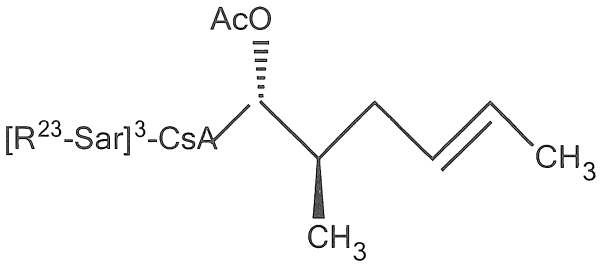
Trong một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình để điều chế hợp chất có công thức L ở trên, bao gồm các bước:

1) cho phản ứng xyclosporin-A (CsA) với một lithi alkylamit có tính bazơ, với sự có mặt của một dung môi thích hợp, sau đó bằng phản ứng với một chất ái điện tử (electrophil) phù hợp để tạo ra hợp chất có công thức 1:



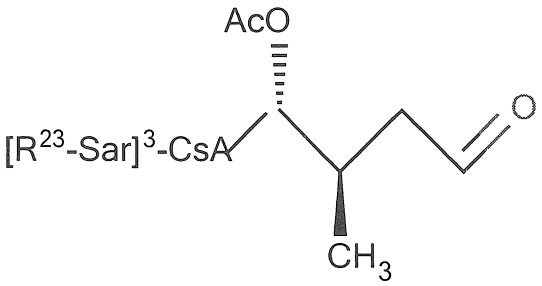
Công thức 1

2) cho phản ứng hợp chất có công thức 1 với AC_2O với sự có mặt của một dung môi thích hợp để tạo thành hợp chất có công thức 2A:



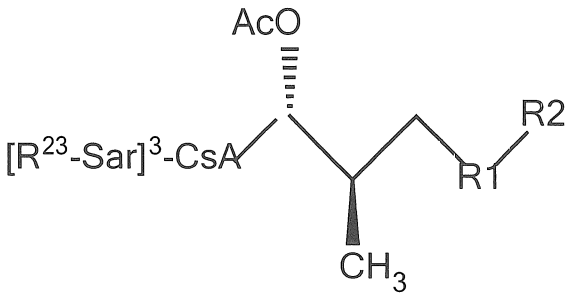
Công thức 2A

3) cho phản ứng hợp chất có công thức 2A với một chất oxy hóa để tạo thành hợp chất có công thức 3A:



Công thức 3A

4) cho phản ứng hợp chất có công thức 3A với một chất ái điện tử để tạo thành hợp chất có công thức 4A:



Công thức 4A

5) tùy ý loại axyl hợp chất có công thức 4A.

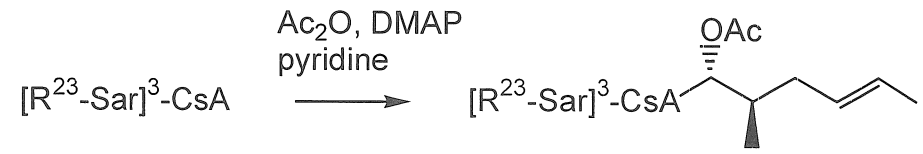
Trong một khía cạnh, quy trình điều chế hợp chất có công thức L ở trên bao gồm việc bổ sung một lượng dư LiCl trong dung môi nói trên để tạo thành chủ yếu là L-epime của công thức L, hoặc quy trình điều hợp chất có công thức L này được thực hiện trong sự vắng mặt của LiCl để tạo thành chủ yếu là D-epime của công thức L. Lithi alkylamit có tính bazơ nói trên có thể là lithi điispropylamit.

Trong một khía cạnh, chất ái điện tử nói trên được chọn từ nhóm được xác định trong bảng sau đây, để tạo ra R23 tương ứng được nêu trong bảng này:

Chất ái điện tử	R23
metyl iođua	$-CH_3$
etyl iođua	$-CH_2CH_3$
allyl bromua	$-CH_2CHCH_2$
1,3-điiođopropan	$-CH_2CH_2CH_2I$
1,4-điiođobutan	$-(CH_2)_3CH_2I$
trimetylamonium-3-iođopropan hexaflophosphat	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$
propargyl bromua	$-CH_2CCH$
tert-butyl bromoaxetat	$-CH_2CO_2$(t-Bu)
benzyl bromua	$-CH_2Ph$ [2]
formalđehyt	$-CH_2OH$
axetalđehyt	$-CH(OH)CH_3$
pivalalđehyt	$-CH(OH)$(t-Bu) [3]
benzalđehyt	$-CH(OH)Ph$
cacbon đioxit	$-COOH$
đimetyl đisulfit	$-SCH_3$
p-tolyl đisulfit	$-S$(p-Tol) [4]

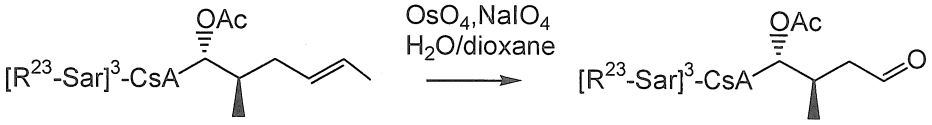
Trong một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế công thức L như được xác định như trên bao gồm các bước:

1) cho phản ứng hợp chất có công thức 1A với đimetylaminopriđin trong một dung môi thích hợp, để tạo thành hợp chất có công thức 2:



1A 2

tiếp theo bởi sự tạo thành tùy ý alđehyt có công thức 3:



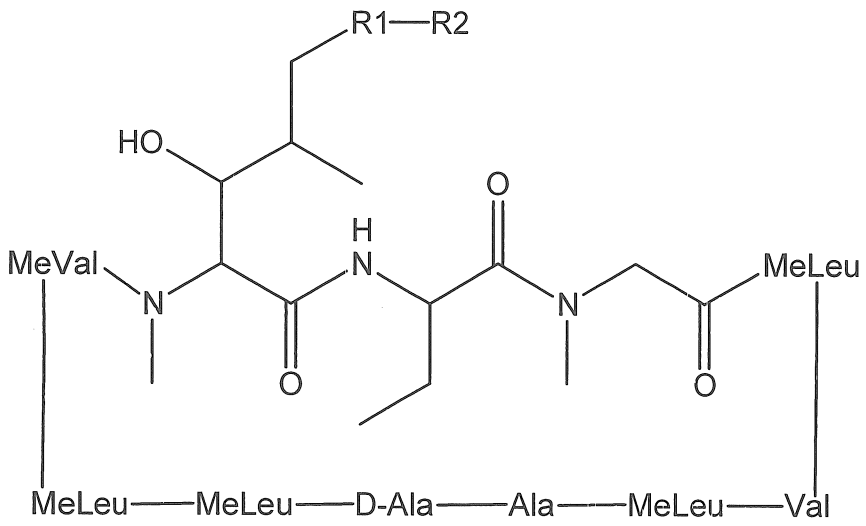
2 3

sau đó tùy ý bởi phản ứng Wittig để tạo thành các hợp chất có công thức L, trong đó R23 được chọn từ nhóm gồm có

i.	$-CH_3$;
ii.	$-CH_2CH_3$;
iii.	$-CH_2CHCH_2$;
iv.	$-CH_2CH_2CH_2I$;
v.	$-(CH_2)_3CH_2I$;
vi.	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$;
vii.	$-CH_2CCH$;
viii.	$-CH_2CO_2(t\text{-}Bu)$;
ix.	$-CH_2Ph^2$;
x.	$-CH_2OH$;
xi.	$-CH(OH)CH_3$;
xii.	$-CH(OH)(t\text{-}Bu)^3$;
xiii.	$-CH(OH)Ph$;
xiv.	$-COOH$;

xv.	$-SCH_3$; và
xvi.	$-S(p\text{-}Tol)$.

Trong một khía cạnh, sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hợp chất có công thức L như được xác định trong tài liệu này bao gồm các bước: cho phản ứng hợp chất có công thức 5 với một lithi alkylamit có tính bazơ, tùy ý bao gồm lithi điispropylamit, với sự có mặt của một chất ái điện tử thích hợp trong dung môi thích hợp để tạo thành hợp chất có công thức L, trong đó R23 bao gồm nhóm C1-C3 alkyl được thế tùy ý.



Công thức 5

Nói chung, đối với tất cả các công thức hóa học được bộc lộ trong tài liệu này:

"Axit cacboxylic" bao gồm nhóm trong đó gốc axit cacboxylic được gắn với một trong các phần tử thế sau:

1. alkyl có thể được thế (ví dụ, alkyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);
2. alkenyl có thể được thế (ví dụ, alkenyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon); và
3. alkynyl có thể được thế (ví dụ, alkynyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);

Phần tử thế của nhóm được mô tả ở trên có thể gồm halogen (ví dụ, flo, clo, brom, iot, flo.) nitro, xyano, hyđroxy, thiol có thể được thế (ví dụ, thiol, C1-4

alkylthio, flo.), amino có thể được thế (ví dụ, amino, mono-C1-4 alkylamino, đi-C1-4 alkylamino, amino vòng có từ 5 đến 6 cạnh ví dụ tetrahyđropyrol, piperazin, piperidin, morpholin, thiomorpholin, pyrol, imiđazol, v.v.), C1-4 alkoxy có thể được halogen hóa (ví dụ, metoxy, etoxy, propoxy, butoxy, triflometoxy, trifloetoxy, v.v.), C1-4 alkoxy-C1-4 alkoxy có thể được halogen hóa (ví dụ, metoxymetoxy, metoxyetoxy, etoxyetoxy, triflometoxyetoxy, trifloetoxyetoxy, v.v.), formyl, C2-4 alkanoyl (ví dụ, axetyl, propionyl, v.v.), C1-4 alkylsulfonyl (ví dụ, metansulfonyl, etansulfonyl, v.v.), và các chất tương tự, và tốt hơn là số lượng của các phần tử thế là từ 1 đến 3.

Ngoài ra, phần tử thế của "amino có thể được thế" có thể liên kết với nhau để tạo thành nhóm amino vòng (ví dụ, gốc được tạo ra bằng cách loại một nguyên tử hyđro ra khỏi nguyên tử nitơ cấu tạo thành vòng của vòng có từ 5 đến 6 cạnh như tetrahyđropyrol, piperazin, piperiđin, morpholin, thiomorpholin, pyrol, imiđazol, v.v. sao cho phần tử thế có thể được gắn với nguyên tử nitơ, hoặc nguyên tử tương tự). Nhóm amino vòng có thể được thế và ví dụ của phần tử thế bao gồm halogen (ví dụ, flo, clo, brom, iot, v.v.), nitro, xyano, hyđroxy, thiol có thể được thế (ví dụ, thiol, C1-4 alkylthio, v.v.), amino có thể được thế (ví dụ, amino, mono-C.sub.1-4 alkylamino, đi-C1-4 alkylamino, amino vòng có từ 5 đến 6 cạnh như tetrahyđropyrol, piperazin, piperiđin, morpholin, thiomorpholin, pyrol, imiđazol, v.v.), cacboxyl có thể được este hóa hoặc amit hóa (ví dụ, cacboxyl, C1-4 alkoxy-cacbonyl, cacbamoyl, mono-C1-4 alkyl-cacbamoyl, đi-C1-4 alkyl-cacbamoyl, v.v.), C1-4 alkoxy có thể được halogen hóa (ví dụ, metoxy, etoxy, propoxy, butoxy, triflometoxy, trifloetoxy, v.v.), C1-4 alkoxy-C.sub.1-4 alkoxy có thể được halogen hóa (ví dụ, metoxymetoxy, metoxyetoxy, etoxyetoxy, triflometoxyetoxy, trifloetoxyetoxy, v.v.), formyl, C2-4 alkanoyl (ví dụ, axetyl, propionyl, v.v.), C1-4 alkylsulfonyl (ví dụ, metansulfonyl, etansulfonyl), và các nhóm tương tự, và tốt hơn là số lượng của các phần tử thế là từ 1 đến 3.

"Amin" bao gồm nhóm có thể không được thế hoặc trong đó gốc amin là được thế N hoặc được thế hai lần N.N có một hoặc hai phần tử thế có thể độc lập được chọn từ:

1. alkyl có thể được thế (ví dụ, alkyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);

2. alkenyl có thể được thế (ví dụ, alkenyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);
3. alkynyl có thể được thế (ví dụ, alkynyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);
4. formyl hoặc axyl có thể được thế (ví dụ, alkanoyl chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon (ví dụ, axetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, v.v.), alkylsulfonyl chứa từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon (ví dụ, metansulfonyl, etansulfonyl, v.v.) và các nhóm tương tự);
5. aryl có thể được thế (ví dụ, phenyl, naphtyl, v.v.); và các nhóm tương tự;

và gắn kết với phần tử thế độc lập được chọn từ phần tử thế như được xác định cho "axit cacboxylic" nêu trên.

"Amit" bao gồm hợp chất trong đó nhóm cacboxylic của gốc amit gắn kết với phần tử thế độc lập được chọn từ phần tử thế như được xác định cho "axit cacboxylic" nêu trên, được gắn kết với nhóm amino của gốc amit được thế N hoặc được thế hai lần N,N có lần lượt một hoặc hai phần tử thế, có thể độc lập được chọn từ:

1. alkyl có thể được thế (ví dụ, alkyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);
2. alkenyl có thể được thế (ví dụ, alkenyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);
3. alkynyl có thể được thế (ví dụ, alkynyl chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon);
4. formyl hoặc axyl có thể được thế (ví dụ, alkanoyl chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon (ví dụ, axetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, v.v.), alkylsulfonyl chứa từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon (ví dụ, metansulfonyl, etansulfonyl, v.v.) và các nhóm tương tự);
5. aryl có thể được thế (ví dụ, phenyl, naphtyl, v.v.); và các nhóm tương tự.

"Aryl" có thể là nhóm hyđrocacbon thơm nhiều vòng hoặc một vòng, và ví dụ, nhóm aryl chứa từ 6 đến 14 nguyên tử cacbon như là phenyl, naphtyl, antryl, phenantryl hoặc axenaphtylenyl, và các nhóm tương tự là được ưu tiên, với phenyl được ưu tiên. Aryl này có thể được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, ví dụ alkoxy thấp (ví dụ, C1-6 alkoxy như metoxy, etoxy hoặc propoxy, v.v.), nguyên tử halogen (ví dụ, flo, clo, brom, iot, v.v.), alkyl thấp (ví dụ, C1-6 alkyl như metyl, etyl hoặc propyl, v.v.), alkenyl thấp (ví dụ, C2-6 alkenyl như vinyl hoặc allyl, v.v.), alkynyl thấp (ví dụ, C2-6 alkynyl như etynyl hoặc propargyl, v.v.), amino có thể được thế, hyđroxyl có thể được thế, xyano, amiđino có thể được thế, cacboxyl, alkoxycacbonyl thấp (ví dụ, C1-6

alkoxycacbonyl như metoxycacbonyl hoặc etoxycacbonyl, v.v.), cacbamoyl có thể được thế (ví dụ, cacbamoyl có thể được thế bằng C1-6 alkyl hoặc axyl (ví dụ, formyl, C2-6 alkanoyl, benzoyl, C1-6 alkoxycacbonyl có thể được halogen hóa, C1-6 alkylsulfonyl có thể được halogen hóa, benzenesulfonyl, v.v.) có thể được thế bằng vòng dị vòng đơn vòng có từ 5 đến 6 cạnh (ví dụ, pyridinyl, v.v.), 1-azetidinylcacbonyl, 1-pyrolidinylcacbonyl, piperidincacbonyl, morpholincacbonyl, thiomorpholincacbonyl (nguyên tử lưu huỳnh có thể được oxi hóa), 1-piperazinylcacbonyl, v.v.), hoặc các gốc tương tự. Phần tử bất kỳ trong số các phần tử thế này có thể độc lập được thế tại từ 1 đến 3 các vị trí thế được.

"Keton" bao gồm hợp chất trong đó nhóm cacbonyl của gốc keton gắn kết với một hoặc hai phần tử thế độc lập được chọn từ phần tử thế như được xác định trên đây cho "axit cacboxylic".

"Este" bao gồm este cacboxylic hoặc este hyđroxy trong đó gốc este chứa một hoặc hai phần tử thế độc lập được chọn từ phần tử thế như được xác định cho "axit cacboxylic" hoặc "aryl".

"Alkyl", trừ phi không được định nghĩa khác, tốt hơn là alkyl chứa từ 1 đến 15 nguyên tử cacbon.

"Gốc thơm" có thể là aryl như được xác định trên đây, hoặc vòng dị vòng đơn vòng thơm chứa từ 5 đến 6 cạnh như furyl, thienyl, pyrolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, isothiazolyl, imidazolyl, pyrazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, furazanyl, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, 1,2,3-triazolyl, 1,2,4-triazolyl, tetrazolyl, pyridyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, triazinyl hoặc gốc tương tự; và vòng dị vòng ngưng tụ thơm chứa từ 8 đến 16 cạnh (tốt hơn là chứa từ 10 đến 12 cạnh).

"Tính không ức chế miễn dịch" ám chỉ khả năng của hợp chất có mức ức chế hệ thống miễn dịch giảm cơ bản so với CsA, như được xác định bằng khả năng của hợp chất ức chế sự tăng sinh của tế bào lympho ở người trong nuôi cấy tế bào và tốt hơn là được xác định bằng phương pháp được trình bày trong ví dụ 19 dưới đây.

"Chất tương tự" có nghĩa là chất tương tự cấu trúc của CsA, khác với CsA về một hoặc nhiều nhóm chức. Tốt hơn là, các chất tương tự này bảo toàn ít nhất một phần lớn khả năng của CsA gắn kết với CyP.

Các hợp chất có công thức I được ưu tiên là hợp chất trong đó R' là H, R1 là alkyl bão hòa hoặc không bão hòa, chứa từ 2 đến 15 nguyên tử cacbon và R2 được chọn từ:

1. axit cacboxylic chứa gốc cacboxyl;
2. amit thế N hoặc thế hai lần N,N trong đó phần tử thế độc lập được chọn từ H, alkyl chứa từ 1 đến 7 nguyên tử cacbon, hoặc phần tử thế này tạo thành vòng dị vòng, trong đó dị tố được chọn từ O, N hoặc S;
3. este chứa từ 1 đến 7 nguyên tử cacbon;
4. alkyl được monohyđroxyl hóa, hoặc đihyđroxyl hóa chứa từ 1 đến 7 nguyên tử cacbon;
5. amin được bảo vệ axyl không được thế hoặc thế N chứa từ 1 đến 7 nguyên tử cacbon;
6. nitril;
7. keton trong đó gốc cacboxylic của keton gắn kết với R1 và mạch alkyl bão hòa hoặc không bão hòa chưa từ 1 đến 7 nguyên tử cacbon;
8. phenyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ nitơ dioxit, flo, amin, este hoặc gốc cacboxyl.

Hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng hợp chất quang hoạt. Sáng chế bao hàm tất cả các chất đồng phân đối ảnh của hợp chất quang hoạt trong phạm vi của công thức nêu trên, cả các raxemat riêng rẽ và trong các hỗn hợp. Sáng chế cũng bao gồm các tiền chất thuốc của các hợp chất được định nghĩa ở đây.

Theo một khía cạnh khác, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa hoặc nghiên cứu bệnh qua trung gian CyP ở động vật có vú, tốt hơn là ở người. Bệnh này thường qua trung gian bởi biểu hiện quá mức CyP, ví dụ biểu hiện quá mức CyP bẩm sinh.

Các bệnh qua trung gian CyP có thể được điều trị bằng hợp chất theo sáng chế gồm có:

a. bệnh nhiễm trùng do virut;

b. bệnh viêm;

c. ung thư;

d. rối loạn thoái hóa cơ;

e. rối loạn thoái hóa thần kinh; và

f. tổn thương liên quan đến mất nội cân bằng canxi tế bào.

Bệnh nhiễm trùng do virut có thể do virut được chọn từ nhóm gồm virut suy giảm miễn dịch người, viêm gan A, viêm gan B, viêm gan C, viêm gan D, và viêm gan E gây ra. Bệnh viêm được chọn từ nhóm gồm bệnh hen, bệnh tự miễn dịch, bệnh viêm mạn tính, bệnh viêm tuyến tiền liệt mạn tính, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh tăng cảm, bệnh viêm ruột, bệnh nhiễm trùng, bệnh tế bào cơ trơn của thành mạch, chứng phình mạch, bệnh viêm khung xương chậu, tổn thương tái tưới máu, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, chứng thải bỏ mảnh ghép, và chứng viêm mạch. Bệnh ung thư có thể được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư tế bào phổi nhỏ và không nhỏ, ung thư bàng quang, ung thư tế bào gan, ung thư tuyến tụy và ung thư vú. Rối loạn thoái hóa cơ có thể được chọn từ nhóm gồm tổn thương tái tưới máu ở cơ tim, chứng loạn dưỡng cơ, và bệnh cơ collagen VI. Rối loạn thoái hóa thần kinh có thể được chọn từ nhóm gồm bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, chứng teo đa hệ, bệnh xơ cứng rải rác, chứng liệt não, bệnh đột quỵ, bệnh thần kinh đái tháo đường, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (bệnh Lou Gehrig), tổn thương dây cột sống, và tổn thương não. Tổn thương liên quan đến sự mất nội cân bằng canxi tế bào có thể được chọn từ nhóm gồm chứng nhồi máu cơ tim, bệnh đột quỵ, tính độc hại gan cấp tính, ứ mật, và trữ/tổn thương tái tưới máu ở cơ quan cấy ghép.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A, 1B và 1C: thể hiện sự ức chế xyclophilin A và sự ức chế miễn dịch của các chất tương tự CsA được cải biến tại vị trí 1 và tại vị trí 1 và 3 theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng nguyên chất hoặc pha với chất mang dược dụng cho động vật máu nóng cần sử dụng. Chất mang dược dụng có thể ở dạng rắn hoặc lỏng. Hợp chất này có thể được sử dụng qua đường miệng, bằng cách rịt, ngoài đường tiêu hóa, bằng cách phun xông hoặc qua trực tràng ở dạng các chế phẩm đơn vị liều chứa tá dược lỏng, tá dược và chất mang dược dụng, không độc thông thường. Thuật ngữ ngoài đường tiêu hóa, khi được sử dụng ở đây, bao gồm các kỹ thuật tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, tiêm mông hoặc truyền.

Dược phẩm chứa các hỗn hợp theo sáng chế có thể ở dạng phù hợp để dùng qua đường miệng, ví dụ, viên nén, viên ngậm, viên ngậm dưới lưỡi, hỗn dịch dạng nước hoặc dầu, bột hoặc hạt phân tán được, nhũ tương, viêng nang cứng hoặc mềm, hoặc xi rô hoặc cồn ngọt. Các chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật bào chế dược phẩm và các chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm chất tạo ngọt, hương liệu, chất tạo màu và chất bảo quản để làm cho chế phẩm chấp nhận được và tinh khiết về dược. Các viên nén chứa hoạt chất trong hỗn hợp với các tá dược dược dụng không độc cũng có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết. Các tá dược được sử dụng có thể là, ví dụ, (1) chất pha loãng trơ như canxi cacbonat, lactoza, canxi phosphat hoặc natri phosphat; (2) chất tạo hạt và chất làm rã như tinh bột ngô hoặc axit alginic; (3) chất liên kết như tinh bột, gelatin hoặc gôm acacia, và (4) chất làm trơn như magie stearat, axit stearic hoặc bột tan. Viên nén có thể không được bao hoặc được bao bằng các kỹ thuật đã biết để làm chậm quá trình phân rã hoặc hấp thụ trong đường dạ dày-ruột và nhờ đó tạo ra tác dụng duy trì trong thời gian dài hơn. Ví dụ, nguyên liệu làm chậm thời gian như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat có thể được sử dụng. Viên nén cũng có thể được bao bằng các kỹ thuật được mô tả trong các patent Mỹ số 4,256,108; 4,160,452; và 4,265,874 để tạo thành viên nén thẩm lọc dùng để giải phóng có kiểm soát.

Trong một vài trường hợp, các chế phẩm để dùng qua đường miệng có thể ở dạng viên nang gelatin cứng trong đó hoạt chất được trộn lẫn với chất pha loãng trơ dạng rắn, ví dụ, canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc kaolin. Các chế phẩm này cũng có thể ở dạng viên gelatin mềm trong đó hoạt chất được trộn lẫn với nước hoặc dầu, ví dụ, dầu lạc, parafin lỏng hoặc dầu ôliu.

Các hỗn dịch chứa nước thường chứa hoạt chất trong hỗn hợp với tá dược phù hợp để bào chế hỗn dịch chứa nước. Các tá dược này có thể gồm: (1) các chất lơ lửng như natri cacboxymetylxenluloza, metylxenluloza, hyđroxypropylmetylxenluloza, natri alginat, polyvinylpyrolidon, gôm tragacan và gôm acacia; hoặc (2) các chất phân tán hoặc làm ẩm có thể là phosphatit có trong tự nhiên như lexitin, sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo, ví dụ, polyoxyetylen stearat, sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài, ví dụ, heptadecaetylenoxyxetanol, sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este không hoàn toàn dẫn xuất từ axit béo và hexitol ví dụ như polyoxyetylen sorbitol monooleat, hoặc sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este không hoàn toàn dẫn xuất từ axit béo và hexitol anhydrit, ví dụ polyoxyetylen sorbitan monooleat.

Các hỗn dịch chứa nước cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản, ví dụ, etyl hoặc n-propyl p-hyđroxybenzoat; một hoặc nhiều chất tạo màu; một hoặc nhiều hương liệu; và một hoặc nhiều chất tạo ngọt như sucroza, aspartam hoặc sacarin.

Các hỗn dịch dạng dầu có thể được điều chế bằng cách treo lơ lửng hoạt chất trong dầu thực vật, ví dụ, dầu lạc, dầu ooliu, dầu vừng hoặc dầu dừa, dầu cá chứa axit béo omega 3, hoặc dầu khoáng như parafin lỏng. Hỗn dịch dạng dầu có thể chứa chất làm đặc, ví dụ sáp ong, parafin rắn và rượu xetyl. Chất tạo ngọt và hương liệu có thể được cho thêm vào để tạo ra chế phẩm ngon dễ dùng qua đường miệng. Các chế phẩm này có thể được bảo quản bằng cách cho thêm chất chống oxi hóa như axit ascorbic.

Các bột và hạt phân tán được là phù hợp để bào chế hỗn dịch chứa nước. Chúng tạo ra hoạt chất trong hỗn hợp với chất phân tán hoặc chất làm ẩm, chất làm treo lơ lửng và một hoặc nhiều chất bảo quản. Các chất phân tán hoặc làm ẩm và làm treo lơ lửng phù hợp được minh họa bằng các chất đã được nêu trên. Các tá dược thêm vào

khác, ví dụ các chất tạo ngọt, hương liệu và chất tạo màu đã được mô tả trên đây cũng có thể được sử dụng.

Dược phẩm chứa hỗn hợp theo sáng chế cũng có thể ở dạng nhũ tương dầu-trong-nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật như dầu ôliu hoặc dầu lạc, hoặc dầu khoáng như parafin lỏng hoặc hỗn hợp của chúng. Các chất nhũ hóa phù hợp có thể là (1) gôm có trong tự nhiên như gôm acacia và gôm tragacan, (2) phosphatit có trong tự nhiên như đậu tương và lexitin, (3) este hoặc este không hoàn toàn 30 dẫn xuất từ axit béo và hexitol anhydrit, ví dụ sorbitan monooleat, (4) các sản phẩm ngưng tụ của các este không hoàn toàn này với etylen oxit, ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat. Các nhũ tương cũng có thể chứa chất tạo ngọt và hương liệu.

Các xi rô và cồn ngọt có thể được điều chế với chất tạo ngọt, ví dụ glyxerol, propylen glycol, sorbitol, aspartam hoặc sucroza. Các chế phẩm này cũng có thể chứa thuốc làm dịu chứng viêm, chất bảo quản, và hương liệu và chất tạo màu.

Dược phẩm có thể ở dạng hỗn dịch chứa dầu hoặc nước vô trùng tiêm được. Hỗn dịch này có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết sử dụng các chất phân tán hoặc làm ẩm và các chất làm treo lơ lửng phù hợp đã nêu trên. Các chế phẩm vô trùng tiêm được cũng có thể là dung dịch vô trùng tiêm được hoặc hỗn dịch trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc dùng được qua đường ngoài đường tiêu hóa, ví dụ như dung dịch trong 1,3-butandiol. Trong số các tá dược lỏng và dung môi chấp nhận được có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, các dầu không bay hơi, vô trùng, được sử dụng thông thường làm dung môi hoặc môi trường làm treo lơ lửng. Để cho mục đích này, dầu không bay hơi không mùi vị bất kỳ có thể được sử dụng gồm có mono hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, các axit béo như axit oleic cũng được sử dụng trong chế phẩm tiêm được.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng ở dạng thuốc viên đạn để dùng qua đường trực tràng. Các chế phẩm thích hợp có thể được điều chế bằng cách trộn hợp chất với tá dược không gây kích ứng phù hợp, ở dạng rắn ở nhiệt độ bình thường tuy nhiên sẽ ở dạng lỏng khi ở nhiệt độ của trực tràng và do đó sẽ tan chảy trong trực tràng để giải phóng thuốc. Các nguyên liệu này là bơ cacao và polyetylen glycol.

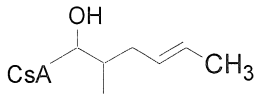
Để dùng ngoài da, các dạng kem, mỡ, gel, dung dịch hoặc hỗn dịch, v.v. phù hợp, thường được sử dụng với xyclosporin có thể được sử dụng.

Trong phương án được ưu tiên đặc biệt, dung dịch lỏng chứa chất hoạt hóa bề mặt, etanol, dung môi ưa chất béo và/hoặc amphiphil làm thành phần không hoạt hóa được sử dụng. Cụ thể, chế phẩm đa nhũ tương để dùng qua đường miệng chứa hỗn hợp chất tương tự đồng phân và các thành phần không dùng để chữa bệnh sau: d-alpha Tocopheryl polyetylen glycol 1000 suxinat (vitamin E TPGS), dầu triglyxerit mạch trung bình (medium chain triglyceride (MCT)), Tween 40, và etanol được sử dụng. Tốt hơn là viên nang gelatin mềm (chứa gelatin, glyxerin, nước, và sorbitol) chứa hợp chất và các thành phần không dùng để chữa bệnh giống như vậy làm dung dịch dùng qua đường miệng cũng có thể được sử dụng.

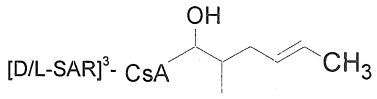
Tuy nhiên, được hiểu rằng nồng độ liều cụ thể cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt độ của hợp chất cụ thể được sử dụng, lứa tuổi, thể trọng, sức khỏe tổng quát, giới tính, chế độ ăn, thời gian dùng thuốc, đường dùng, tỷ lệ thanh thải, sự phối hợp thuốc và bản chất và mức độ trầm trọng của bệnh hoặc tình trạng cụ thể khi được điều trị.

Phương pháp luận

Các phản ứng được trình bày dưới đây, là các ví dụ tổng quát của các phản ứng hóa học có khả năng tổng hợp các hợp chất mong muốn được cải biến tại phần axit amin 1 (AA1) và phần axit amin 3 (AA3) của CsA; Sự cải biến AA1 được mô tả là



và sự cải biến AA3 được mô tả là:



cả hai sự cải biến AA1 và AA3 sử dụng các chất phản ứng có các tính chất hóa học cần thiết, và được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng việc thay thế một số chất phản ứng nhất định là có thể.

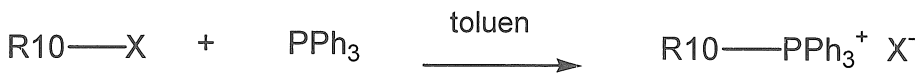
Việc nhận dạng và độ tinh khiết của các hợp chất được điều chế nói chung được xác lập bằng các phương pháp gồm có phổ khối, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Phổ khối (ESI-MS) được đo bằng hệ thống Hewlett Packard 1100 MSD. Phổ NMR được đo bằng phổ kế Varian MercuryPlus 400 MHz trong dung môi đã đơteri hóa (DMSO cho muối phospho, benzen cho tất các hợp chất khác). HPLC pha đảo điều chế và phân tích được tiến hành bằng hệ Agilent 1100 Series.

Tổng hợp các hợp chất muối phospho

Muối phospho được điều chế bằng phản ứng của triphenylphosphin hoặc phosphin phù hợp khác bất kỳ với alkyl halogenua (R-X; X = Cl, Br, hoặc I). Các alkyl halogenua phù hợp là các halogenua béo bậc nhất hoặc bậc hai bất kỳ có độ dài mạch bất kỳ hoặc trọng lượng phân tử bất kỳ. Các alkyl halogenua này có thể có hoặc không có mạch nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa.

Nếu phản ứng được tiến hành trong toluen (Phản ứng 1), sản phẩm kết tủa trực tiếp từ dung dịch phản ứng. Tuy nhiên, các chất tác dụng không phản ứng cần dùng dung môi phân cực hơn như đimetylformamit (DMF) (Phản ứng 2) để rút ngắn thời gian phản ứng và thu được hiệu suất thỏa đáng.

Phản ứng 1:



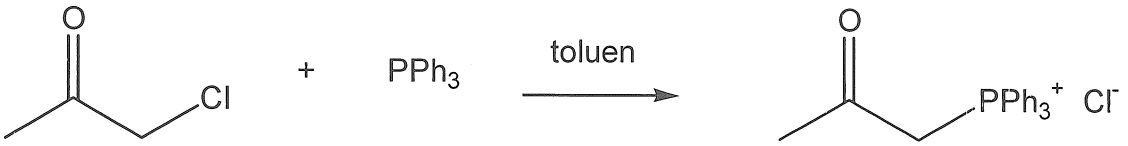
Công thức V

Khi X là halogenua (bao gồm nhưng không giới hạn ở Cl, Br, và I), và R10 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm keton, hyđroxyl, nitril, axit cacboxylic, este và 1,3-dioxolan; gốc thơm, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm halogenua, este và nitro; hoặc hỗn hợp

gồm mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa nêu trên và các gốc thơm nêu trên.

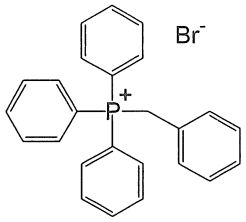
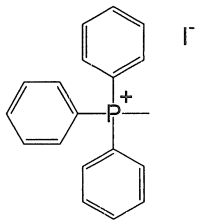
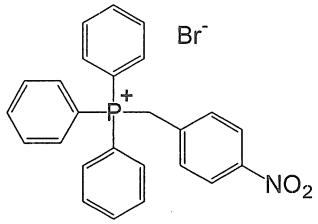
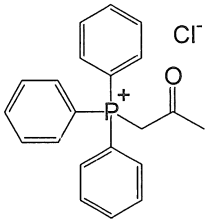
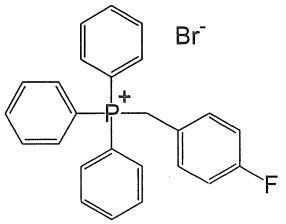
Ví dụ thực hiện sáng chế

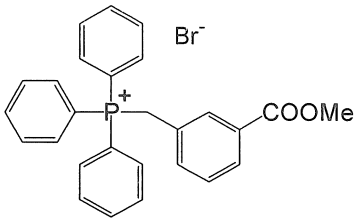
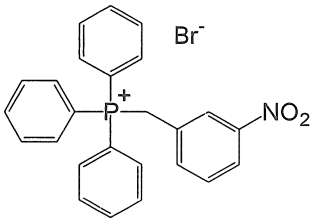
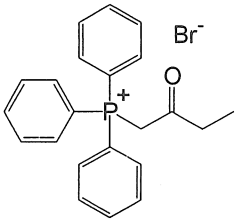
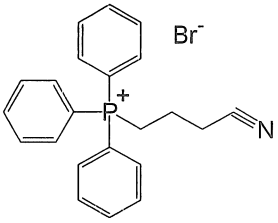
Ví dụ 1: Quy trình tổng hợp 404-15



Để làm ví dụ minh họa, triphenylphosphin (13mmol) được hòa tan trong 50ml toluen và cloaxeton (10mmol) được cho thêm vào để tạo thành dung dịch trong suốt. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm. Chất rắn không màu được lọc, được rửa bằng toluen và hexan và được làm khô trong chân không.

Sử dụng phản ứng 1, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của hợp chất mà có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Chất phản ứng (R10-X)	Điều kiện
404-08 	benzyl bromua	4 giờ ở nhiệt độ hồi lưu
404-09 	metyl iođua	ở nhiệt độ phòng qua đêm
404-12 	4-nitrobenzyl bromua	6 giờ ở nhiệt độ hồi lưu
404-15 	cloaxeton	ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm
404-64 	4-flobenzyl bromua	ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm
404-77	metyl 3-bromometylbenzoat	6 giờ ở nhiệt độ hồi lưu

		
404-87	3-nitrobenzyl bromua	6 giờ ở nhiệt độ hồi lưu
		
404-161	1-bromo-2-butanon	ở nhiệt độ phòng qua đêm
		
404-170	4-bromobutyronitril	ở nhiệt độ hồi lưu qua đêm
		

Theo cách khác, muối phospho phù hợp có thể được tổng hợp bằng Phản ứng 2 như được minh họa dưới đây:

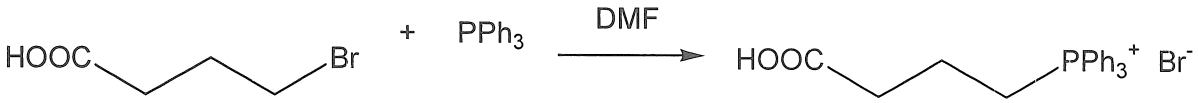
Phản ứng 2:

Công thức VI

ở đây X là halogenua (bao gồm nhưng không giới hạn ở Cl, Br, và I), và R10 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm keton, hyđroxyl, nitril, axit cacboxylic, este và 1,3-đioxolan; nhóm thơm, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm halogenua, este và nitro; hoặc

hỗn hợp gồm mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa nêu trên và gốc thơm nêu trên.

Ví dụ 2: Quy trình tổng hợp 404-51

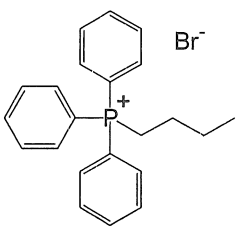


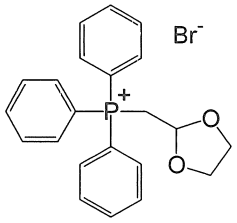
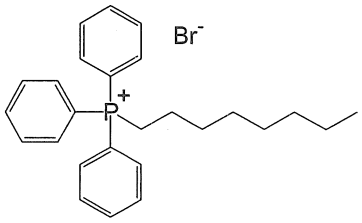
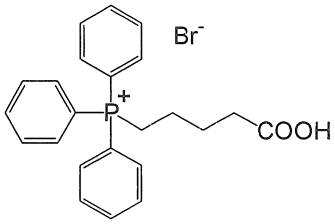
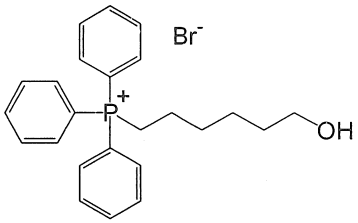
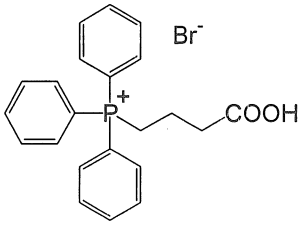
Để làm ví dụ minh họa, triphenylphosphin (11mmol) được hòa tan trong 10ml DMF và axit 4-bromobutyric (10mmol) được cho thêm vào. Phản ứng được khuấy 7 giờ ở nhiệt độ 110°C và tiếp đó được để nguội qua đêm. 50ml toluen được cho thêm vào và chất rắn dạng tinh thể không màu được gom bằng cách lọc. Sản phẩm được rửa bằng toluen và hexan và được làm khô trong chân không qua đêm.

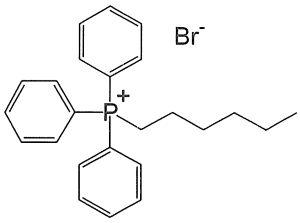
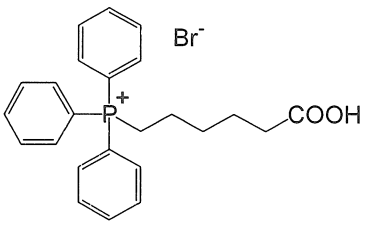
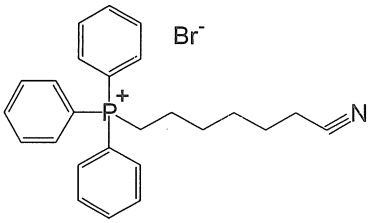
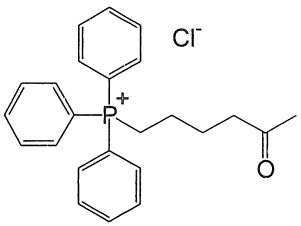
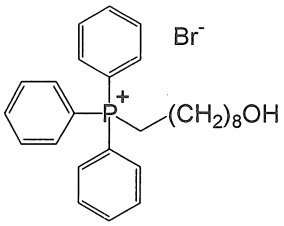
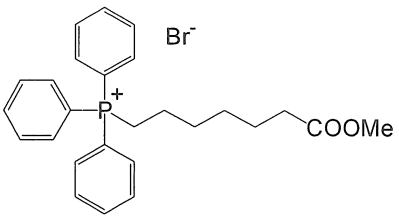
Nếu quá trình kết tinh không bắt đầu sau khi xử lý với toluen, sản phẩm được tách bằng 20ml MeOH/H_2O (hỗn hợp có tỷ lệ 1:1). Pha nước được rửa bằng toluen và hexan và được làm khô.

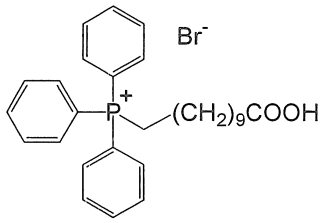
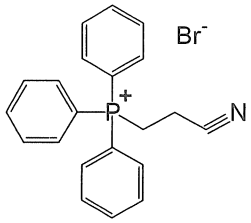
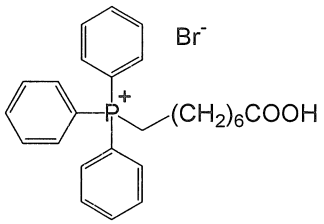
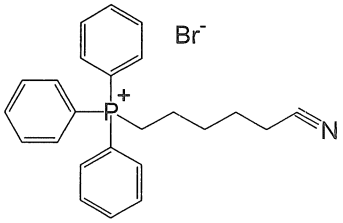
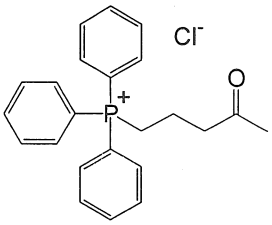
Phần cặn được khuấy với 50ml etyl axetat (EtOAc) ở nhiệt độ hồi lưu trong 20-30 phút. Nếu thu được chất rắn tinh thể, sản phẩm được gom bằng cách lọc, rửa bằng EtOAc và hexan và được làm khô. Trong trường hợp sản phẩm thu được ở dạng dầu hoặc gôm, EtOAc được gạn và sản phẩm còn lại được làm khô trong chân không.

Sử dụng phản ứng 2, các hợp chất sau là các ví dụ thêm nữa của hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Chất phản ứng (R11-X)	Điều kiện
404-14 	1-bromobutan	6,5 giờ ở nhiệt độ 120°C
404-29	2-bromometyl-1,3-dioxolan	120°C qua đêm

		
404-34	1-bromooctan	110°C qua đêm
		
404-51	axit 5-bromovaleric	8 giờ ở nhiệt độ 120°C
		
404-78	6-bromohexanol	110°C qua đêm
		
404-116	Axit 4-bromobutyric	7 giờ ở nhiệt độ 110°C
		
416-01	1-bromohexan	110°C qua đêm

		
416-02	axit 6-bromohexanoic	110°C qua đêm
		
419-132	7-bromoheptanenitril	110°C qua đêm
		
419-134	6-clo-2-hexanon	110°C qua đêm
		
419-136	9-bromo-1-nonanol	110°C qua đêm
		
420-32	metyl 7-bromohexanoat	110°C qua đêm
		

420-78	axit 11-bromoundecanoic	110°C qua đêm
		
420-80	3-bromopropionitril	110°C qua đêm
		
420-82	axit 8-bromooctanoic	110°C qua đêm
		
420-90	6-bromohexannitril	110°C qua đêm
		
420-94	5-clo-2-pentanon	110°C qua đêm
		

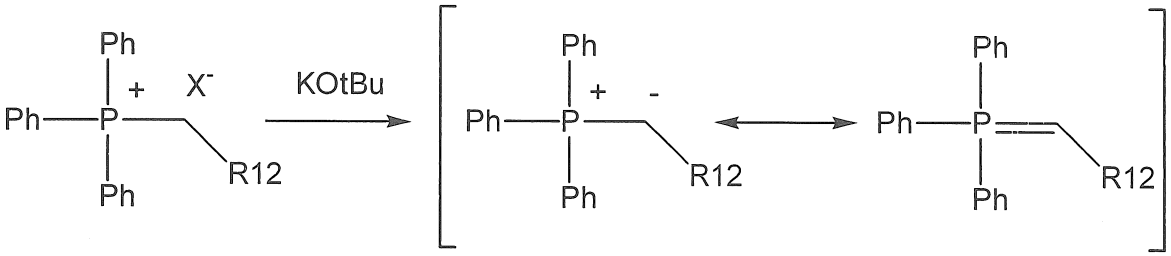
Phản ứng Wittig

Phản ứng Wittig được sử dụng rộng rãi cho nhiều chất nền và chất phản ứng. Mạch bên, được tạo ra cho chất nền trong phản ứng có thể đại diện cho số lượng hợp

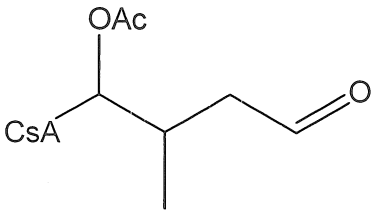
chất béo, bão hoà và không bão hoà, mạch thẳng hoặc mạch nhánh bất kỳ có độ dài thay đổi (R') và có thể chứa nhiều nhóm chức.

Trong phản ứng Wittig, bazơ, như kali tert-butoxit (KOtBu) được dùng để tạo ra ylid từ muối phospho. Ylid phản ứng với gốc cacbonyl của chất nền, CsA-aldehyt, để tạo thành alken. Muối phospho chứa mạch bên của axit cacboxylic cần ít nhất hai đương lượng bazơ để tạo ra ylid.

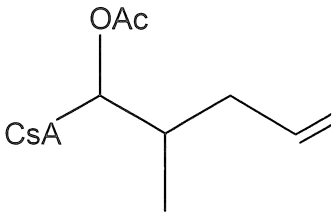
Phản ứng 3: Quy trình tổng hợp chất trung gian của chất tương tự xyclosporin được axetyl hoá bằng cách sử dụng hợp chất muối phospho thông qua phản ứng Wittig



Công thức VIII



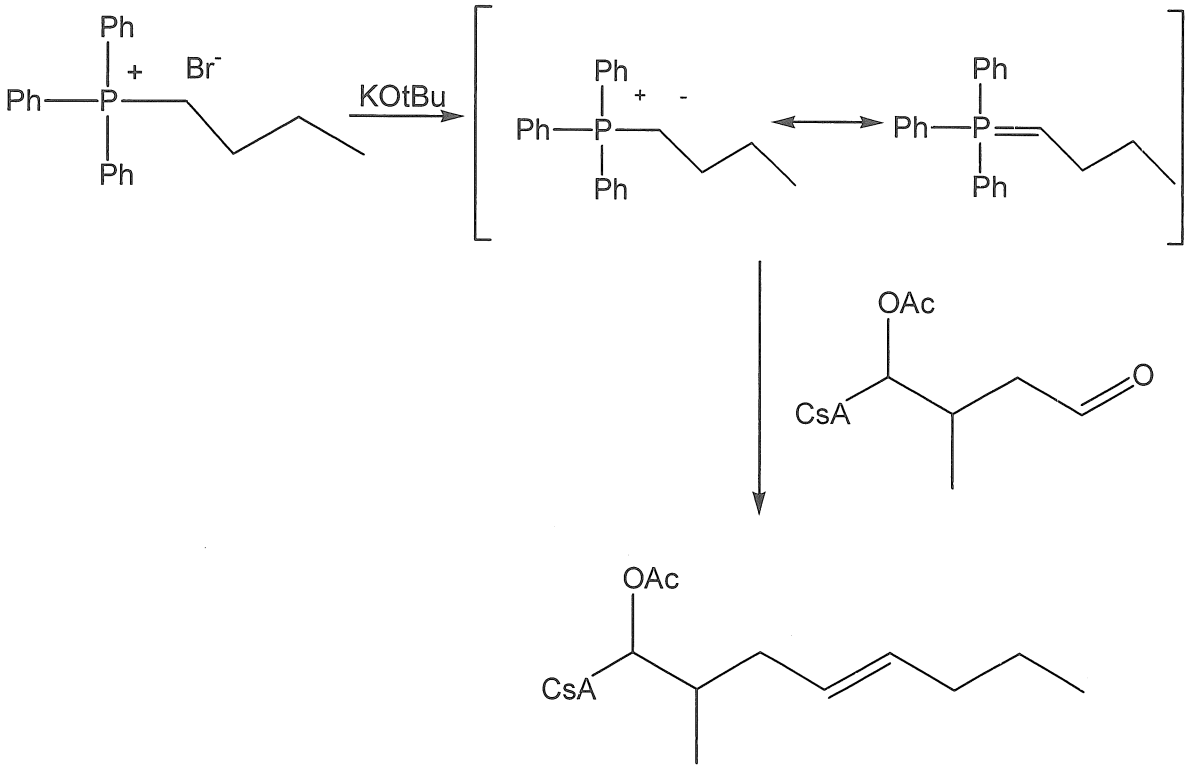
Công thức IX



Công thức X

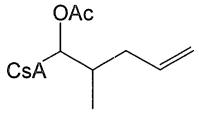
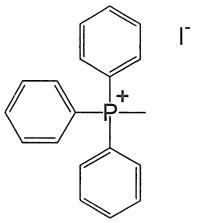
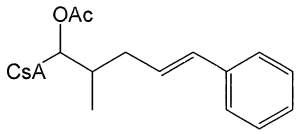
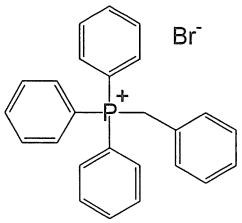
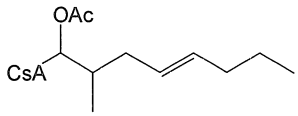
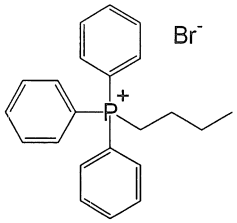
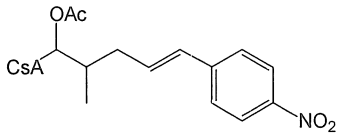
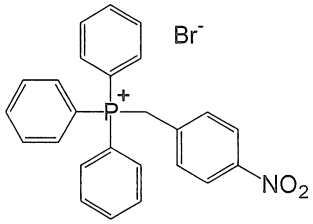
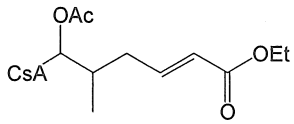
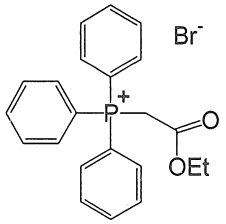
ở đây X là halogenua (bao gồm nhưng không giới hạn ở Cl, Br, và I), và R12 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm keton, hyđroxyl, nitril, axit cacboxylic, este và 1,3-dioxolan; nhóm thơm, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm halogenua, este và nitro; hoặc hỗn hợp gồm mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa nêu trên và nhóm thơm nêu trên.

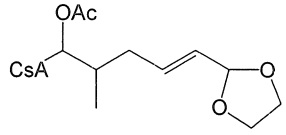
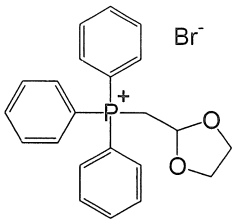
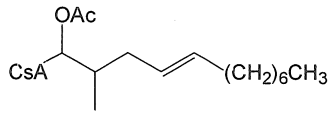
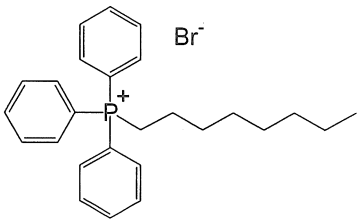
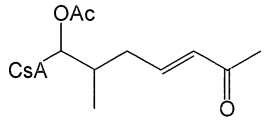
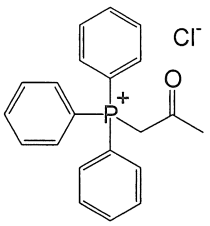
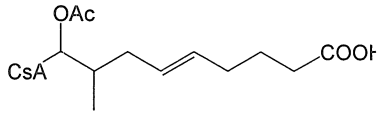
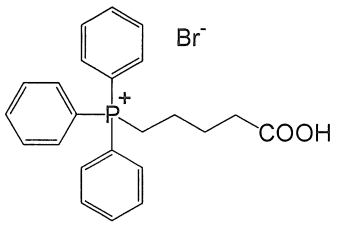
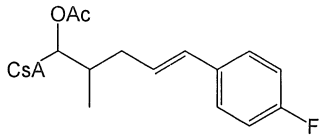
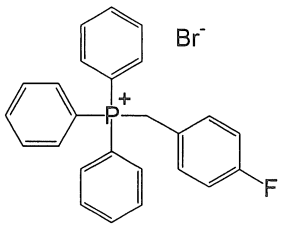
Ví dụ 3: Quy trình tổng hợp hợp chất 404-20 sử dụng hợp chất muối phospho thông qua phản ứng Wittig:

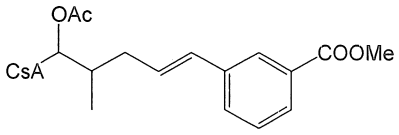
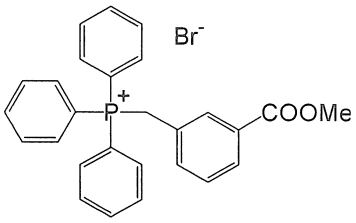
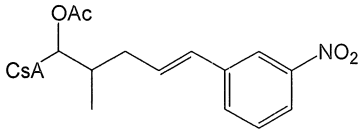
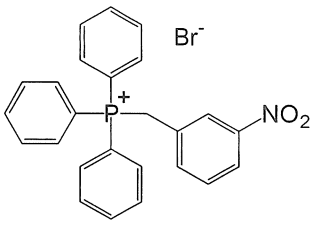
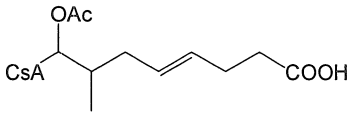
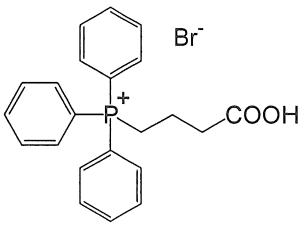
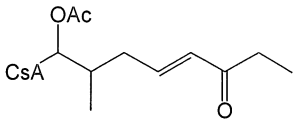
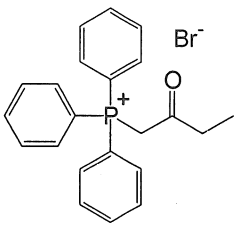


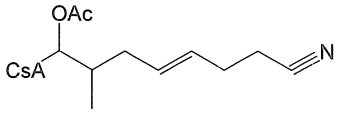
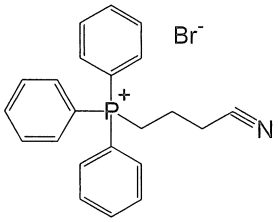
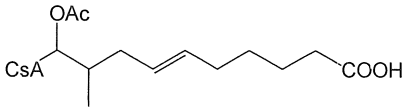
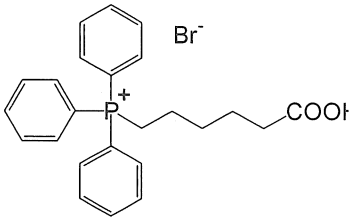
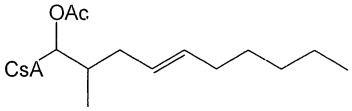
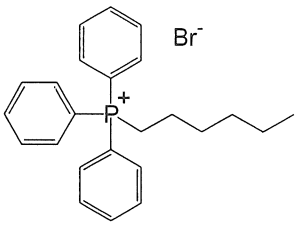
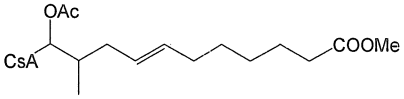
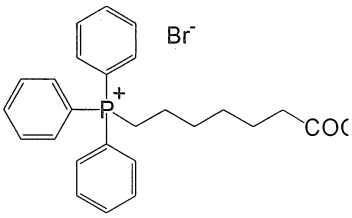
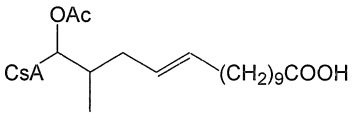
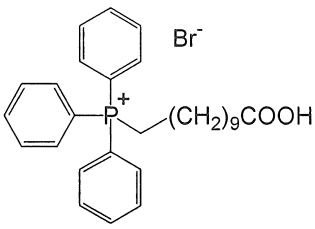
Để làm ví dụ minh họa, bình thót cổ dung tích 250ml đã được làm khô, được nạp, trong môi trường argon, triphenylbutylphospho bromua (6,0mmol) và 40ml tetrahyđrofuran khan (THF). Huyền phù được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và kali tert-butoxit (6,0mmol) được cho thêm vào để có màu cam. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian từ 1-2 giờ, tiếp đó CsA-alđehyt (2,0mmol, đã hòa tan trong 20ml THF khan) được cho thêm vào. Khuấy tiếp tục trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được dập tắt bằng 10ml NH_4Cl bão hòa và 20ml nước đá. Các lớp được tách và pha nước được chiết bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ được gom, được rửa bằng nước muối và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ và sản phẩm thô được tinh chế bằng silica gel (hexan/axeton 3:1).

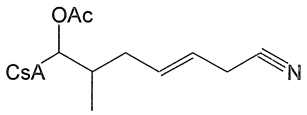
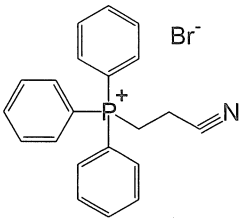
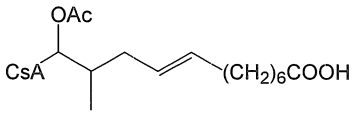
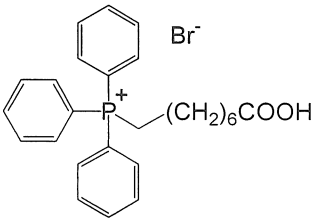
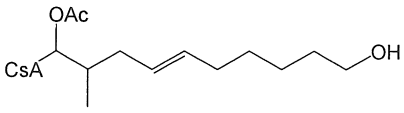
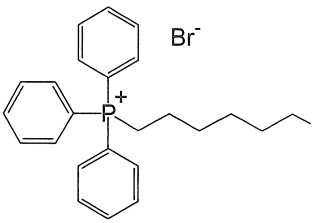
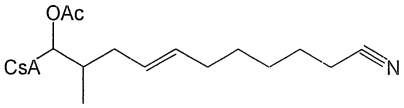
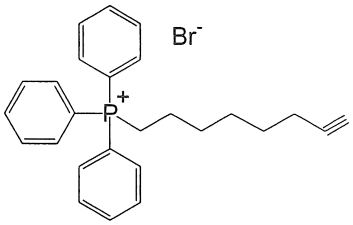
Sử dụng phản ứng 3, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)	Chú ý
404-16	404-09	1252,9	
			
404-19	404-08	1328,9	
			
404-20	404-14	1294,9	
			
404-30	404-12	1373,9	khuấy ở nhiệt độ 60°C qua đêm
			
404-31		1324,9	khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 2 ngày
			
404-33	404-29	1325,0	

			
404-40	404-34	1351,2	
			
404-43	404-15	1295,1	khuấy ở nhiệt độ hồi lưu trong 10 ngày
			
404-59	404-51	1338,9	2 đương lượng KOtBu
			
404-65	404-64	1347,1	
			

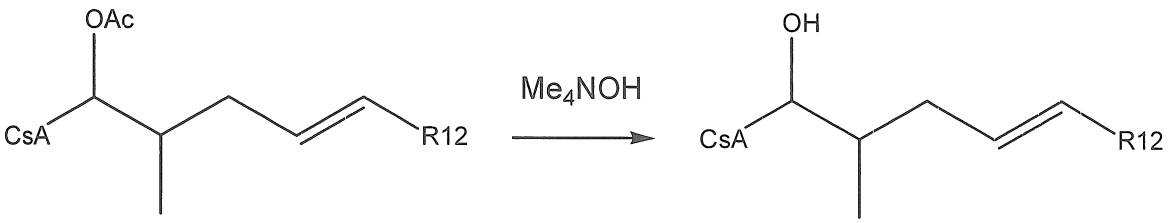
404-79 	404-77 	1386,9	khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm
404-89 	404-87 	1374,1	khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày
404-134 	404-116 	1325,0	2 đương lượng KOtBu; khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày
404-163 	404-161 	1308,8	khuấy ở nhiệt độ hồi lưu trong 15 ngày

404-187 	404-170 	1305,9	khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm
416-04 	416-02 	1353,0	2 đương lượng KOtBu
416-09 	416-01 	1323,1	
420-40 	420-32 	1381,0	khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm
420-85 	420-78 	1423,1	2 đương lượng KOtBu

420-89 	420-80 	1291,9	
420-92 	420-82 	1381,1	2 đương lượng KOtBu
420-96 	404-78 	1338,9	
420-101 	419-132 	1347,9	

Khử axetyl hóa

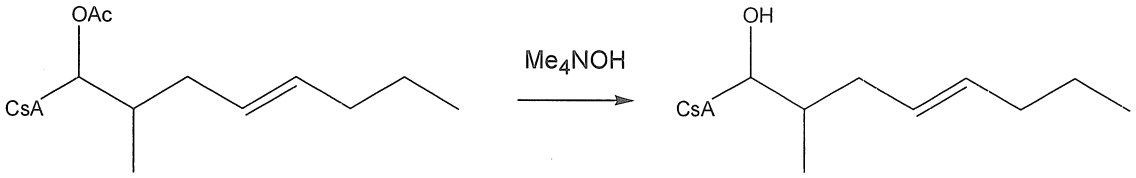
Phản ứng 4: Khử axetyl của chất tương tự xyclosporin được axetyl hóa



Công thức X Công thức XI

ở đây R12 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm keton, hyđroxyl, nitril, axit cacboxylic, este, amit, amin được bảo vệ axyl và 1,3-dioxolan; nhóm thơm, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm halogenua, este, amin và nitro; hoặc hỗn hợp gồm mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa nêu trên và nhóm thơm nêu trên.

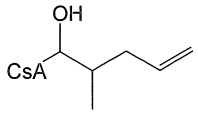
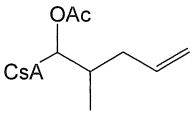
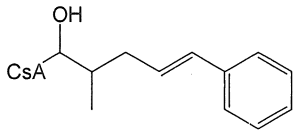
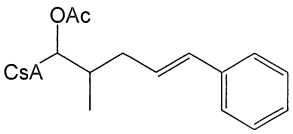
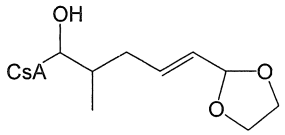
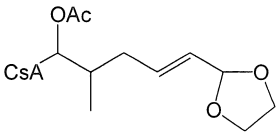
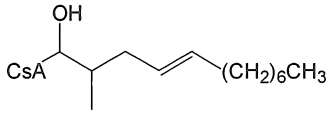
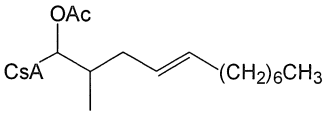
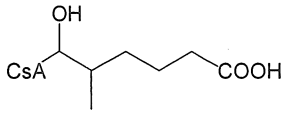
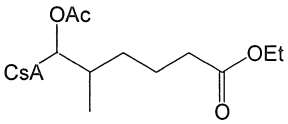
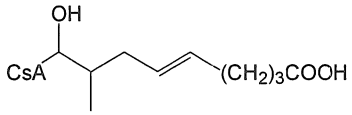
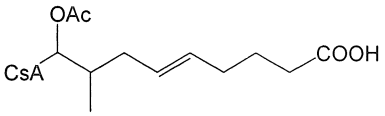
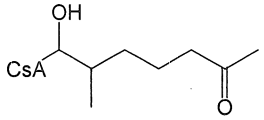
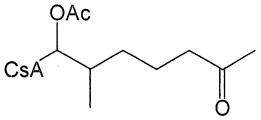
Ví dụ 4: Quy trình tổng hợp hợp chất 404-90 bằng khử axetyl

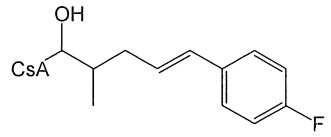
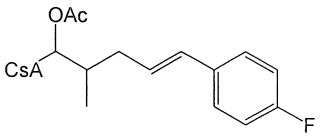
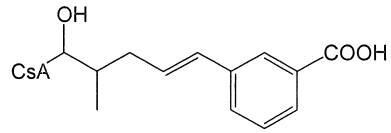
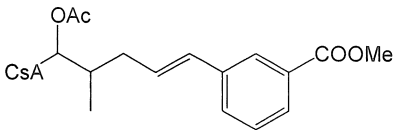
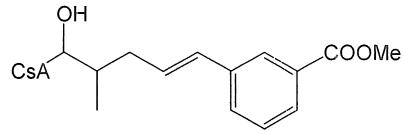
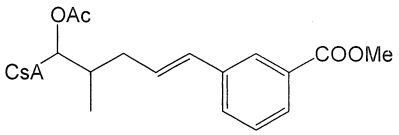
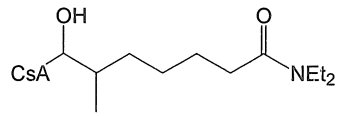
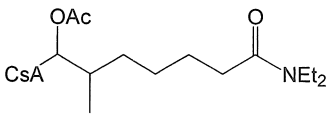
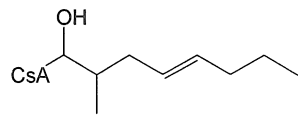
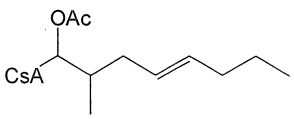
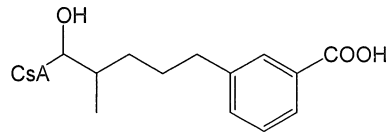
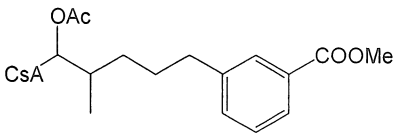
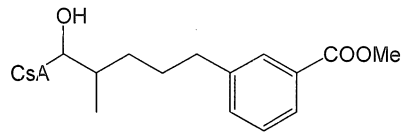
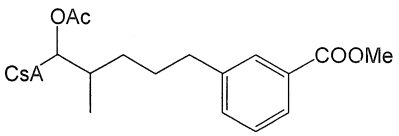
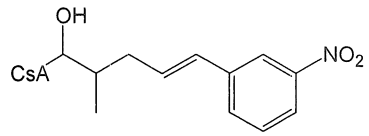
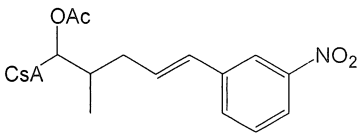


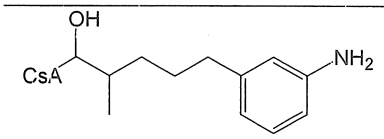
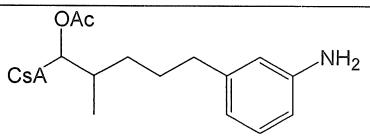
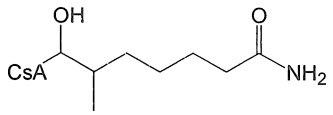
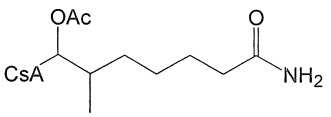
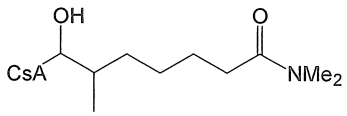
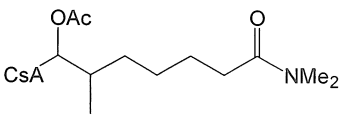
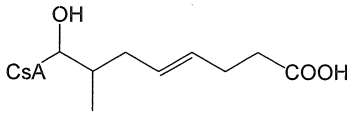
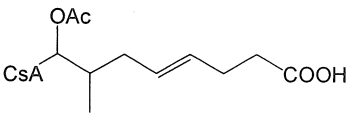
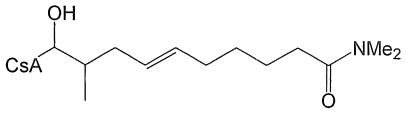
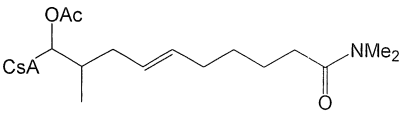
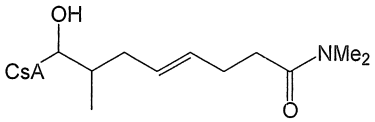
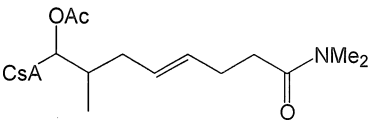
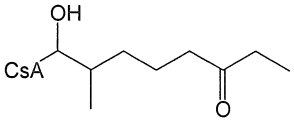
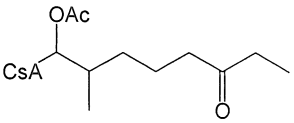
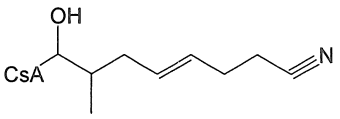
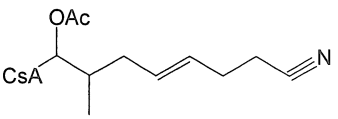
Để làm ví dụ minh họa, dung dịch của 404-20 (0,16mmol) trong 10ml MeOH được kết hợp với dung dịch của tetrametylammonihydroxit pentahydrat (0,47mmol) trong 2ml H_2O. Hỗn hợp d fkhuaasy ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Phản ứng được cô trong chân không và 5ml H_2O được cho thêm vào. Phản ứng được chiết bằng EtOAc, phần chiết được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng Na_2SO_4 và được cô đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế pha đảo.

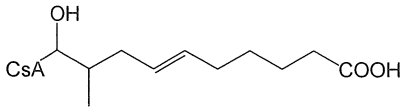
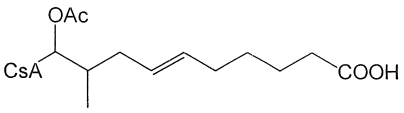
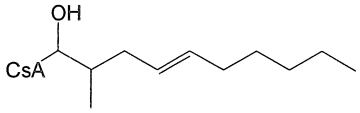
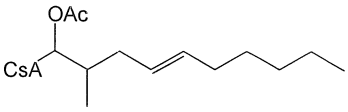
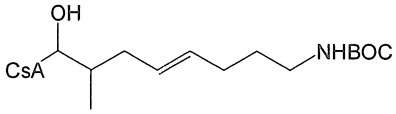
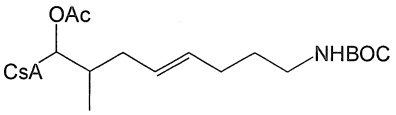
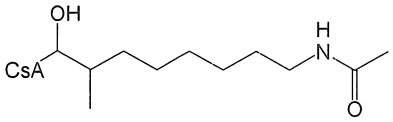
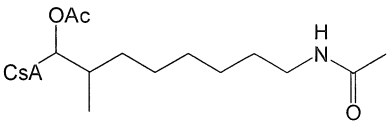
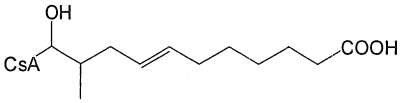
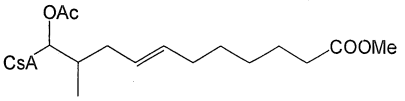
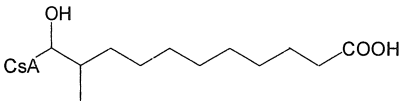
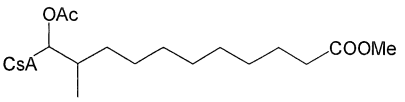
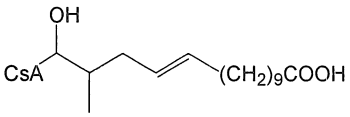
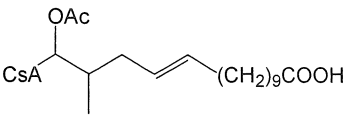
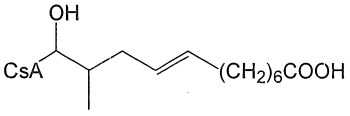
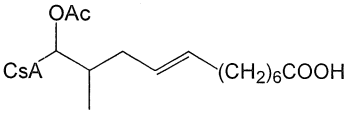
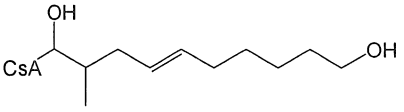
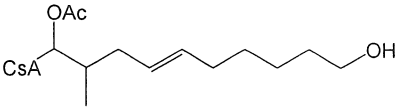
Quy trình tinh chế hợp chất được khử axetyl thường được thực hiện bằng silica gel (hexan/axeton 2:1) hoặc bằng HPLC điều chế. Trong trường hợp của các hợp chất 404-60, 404-137, 416-08, 420-98 và 420-100 (các axit cacboxylic), phản ứng được axit hóa đến số độ pH 2-3 bằng HCl 1M trước khi chiết.

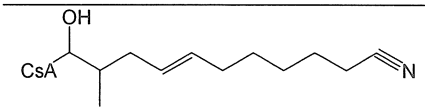
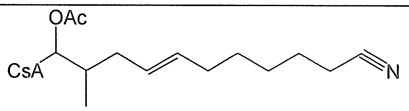
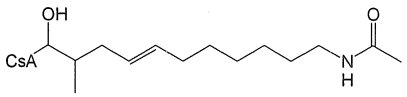
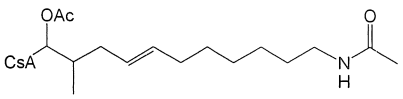
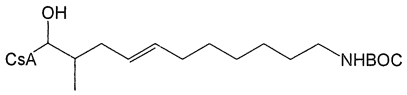
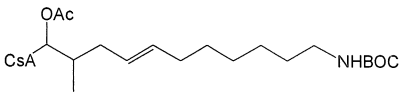
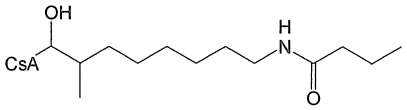
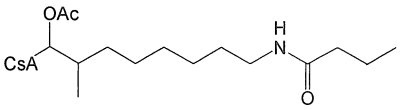
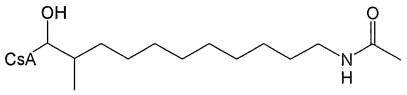
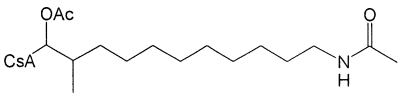
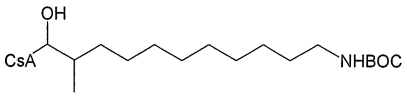
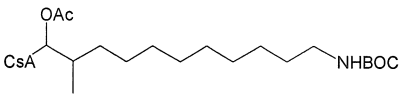
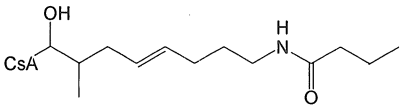
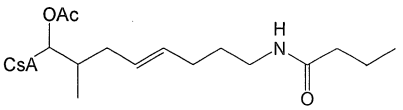
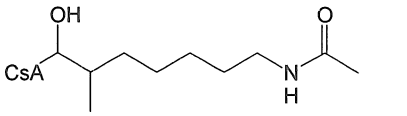
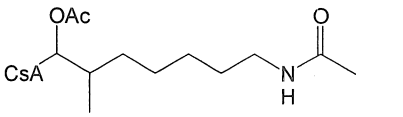
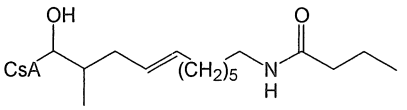
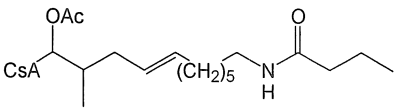
Sử dụng phản ứng 4, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)
404-22 	404-16 	1210,9
404-25 	404-19 	1287,0
404-36 	404-33 	1283,0
404-44 	404-40 	1309,1
404-58 	404-57 	1257,1
404-60 	404-59 	1297,1
404-61 	404-56 	1255,1

404-66	404-65	1305,1
		
404-81-1	404-79-1	1331,1
		
404-81-2	404-79-1	1345,1
		
404-85	404-83	1326,2
		
404-90	404-20	1253,0
		
404-96-1	404-94	1333,0
		
404-96-2	404-94	1347,0
		
404-97	404-89	1331,9
		
404-125	404-120	1304,0

		
404-130	404-128	1270,1
		
404-132	404-129	1298,0
		
404-137	404-134	1283,0
		
404-154	404-150	1338,1
		
404-157	404-155	1310,0
		
404-173	404-172	1268,9
		
404-194	404-187	1263,9
		

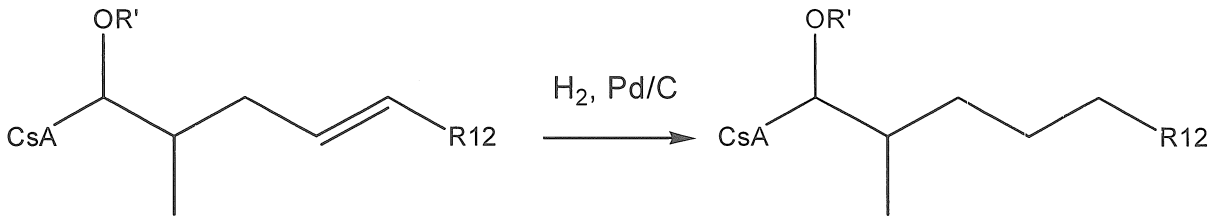
416-08 	416-04 	1311,0
416-13 	416-09 	1281,1
420-17 	420-08-1 	1368,0
420-30-1 	420-27 	1312,0
420-43 	420-40 	1324,9
420-47 	420-46 	1327,0
420-98 	420-85 	1381,1
420-100 	420-92 	1339,1
420-102 	420-96 	1297,0
420-108	420-101	1305,9

		
420-117	420-109-1	1352,1
		
420-120	420-110-1	1410,0
		
420-122	420-107-2	1340,0
		
420-124	420-109-2	1354,0
		
420-125	420-110-2	1412,0
		
420-126	420-107-1	1337,9
		
420-131	420-130	1297,9
		
420-132	420-128-1	1380,0
		

Hyđro hóa liên kết đôi

Liên kết đôi có thể được hyđro hóa ở áp suất không khí để tạo ra mạch bên bão hòa. Các nhóm chức như hyđroxyl, cacbonyl và cacboxyl ổn định ở điều kiện như vậy và không cần bảo vệ. R' là gốc axetyl hoặc hyđro. Trong trường hợp của hợp chất cacbonyl không bão hòa α,β, liên kết đôi phải được khử trước khi khử axetyl hóa để tránh kết tinh bằng cách cho thêm nhóm hyđroxy tự do ái nhân vào liên kết đôi đã hoạt hóa.

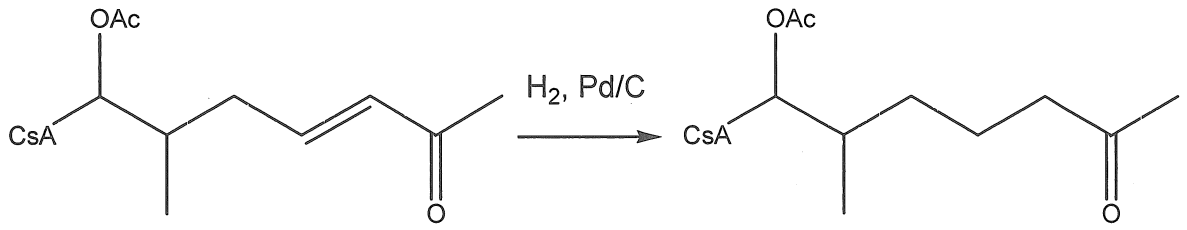
Phản ứng 5:



Công thức XII Công thức XIII

ở đây R12 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm keton, hyđroxyl, nitril, axit cacboxylic, este, amit, amin được bảo vệ axyl và 1,3-dioxolan; nhóm thơm, tùy ý chứa phần tử thế được chọn từ nhóm gồm halogenua, este, amin và nitro; hoặc hỗn hợp của mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa nêu trên và nhóm thơm nêu trên, và R` là H hoặc gốc axetyl.

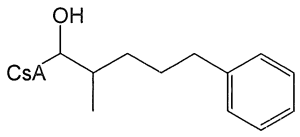
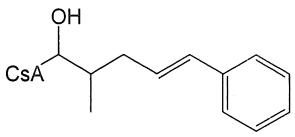
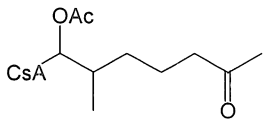
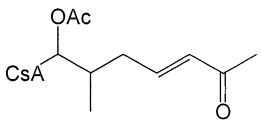
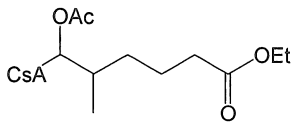
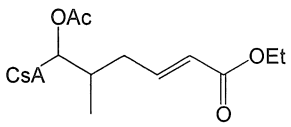
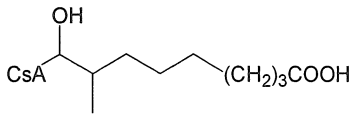
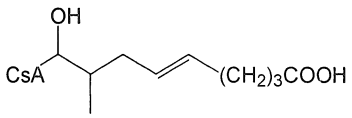
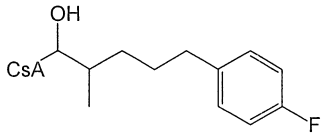
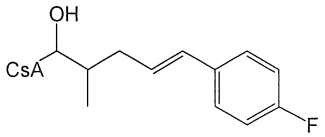
Ví dụ 5: Quy trình tổng hợp 404-56:

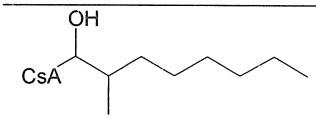
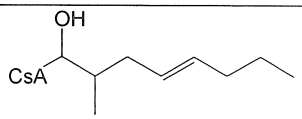
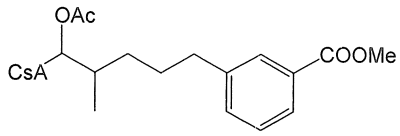
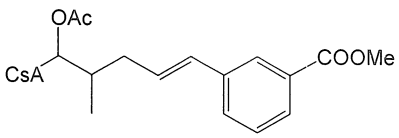
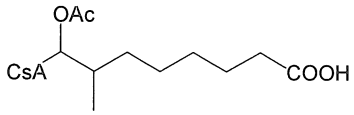
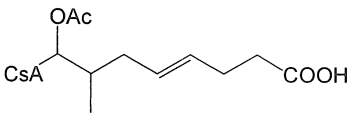
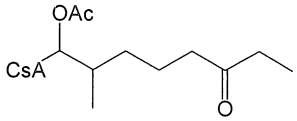
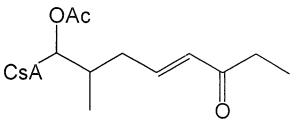
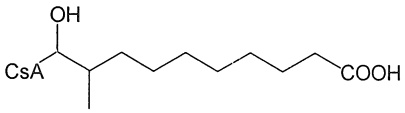
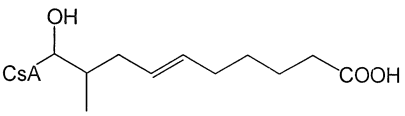
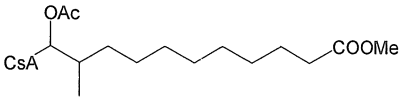
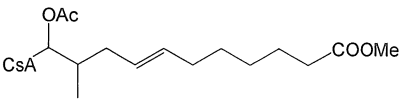
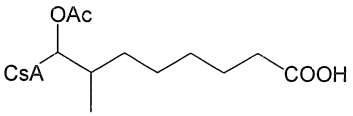
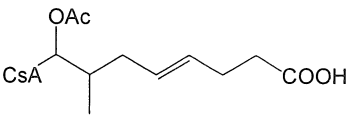
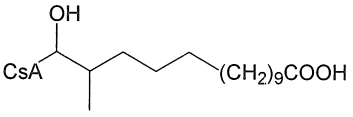
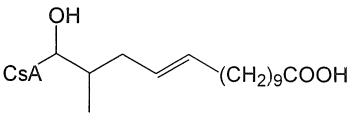
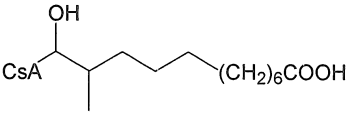
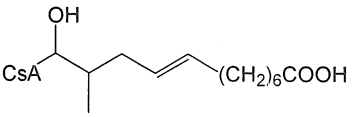


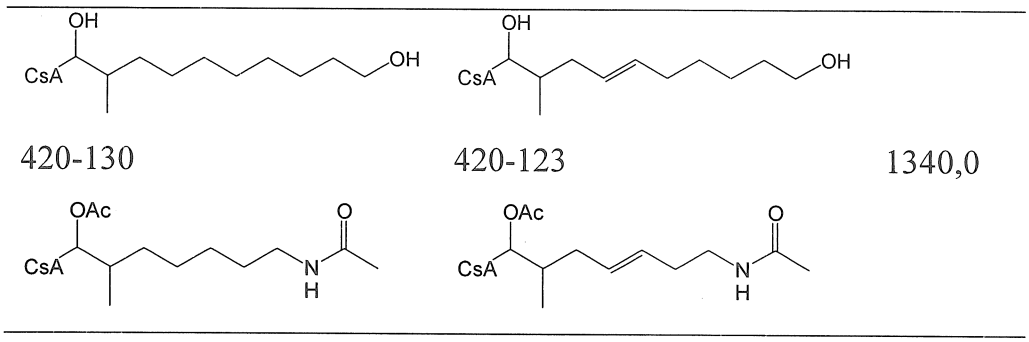
Để làm ví dụ minh họa, 404-43 (0,34mmol) được hòa tan trong 40ml EtOH khan và 43mg Pd/C (10%) và 0,2ml axit axetic được cho thêm vào. Hỗn hợp được khuấy trong môi trường hyđro ở áp suất khí quyển trong 2 ngày. Phản ứng được lọc

bằng Celite và được cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Sử dụng phản ứng 5, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)
404-50	404-25	1289,1
		
404-56	404-43	1297,0
		
404-57	404-31	1327,1
		
404-63	404-60	1299,1
		
404-74	404-66	1307,1
		
404-92	404-90	1255,1

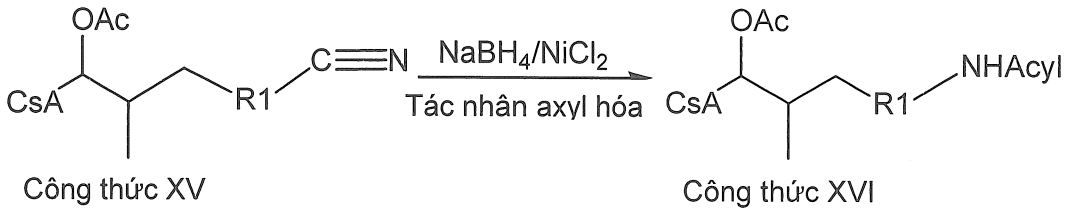
		
404-94	404-79	1388,9
		
404-168	404-134	1326,8
		
404-172	404-163	1310,9
		
420-19	416-08	1313,0
		
420-46	420-40	1383,1
		
420-68	420-134	1326,9
		
420-106	420-98	1383,1
		
420-111	420-100	1341,0
		
420-112	420-102	1298,9



Khử nhóm nitril

Quy trình khử nhóm nitril cho amin bậc một tương ứng có thể thực hiện bằng niken borua được tạo ra *in situ* từ natri bohyđrua ($NaBH_4$) và niken(II)clorua ($NiCl_2$). Việc cho thêm tác nhân bẫy phù hợp dẫn đến amin bậc một được bảo vệ axyl (cacbamat hoặc amit, lần lượt) và ngăn ngừa sự hình thành amin bậc hai như là phản ứng phụ không mong muốn. Liên kết đôi được khử một phần trong điều kiện đã cho và thu được hỗn hợp sản phẩm. Cả hai hợp chất amin được bảo vệ bão hòa và không bão hòa được phân tách và tinh chế. Đối với Phản ứng 420-123, hỗn hợp không được phân tách. Thay vì đó, hỗn hợp được hyđro hóa có xúc tác để tạo thành hợp chất bão hòa hoàn toàn.

Phản ứng 6:

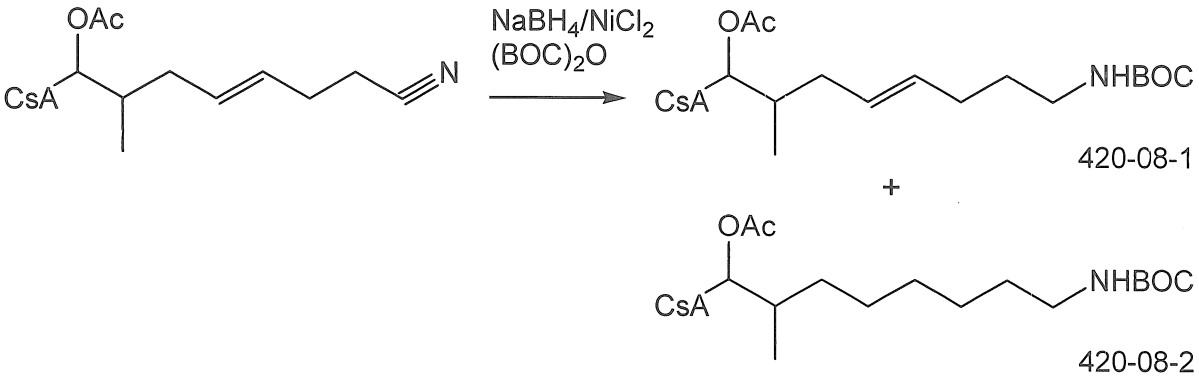


Công thức XV

Công thức XVI

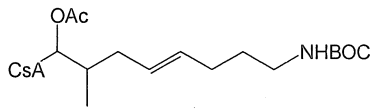
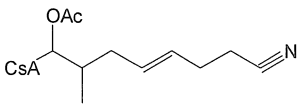
khi axyl là gốc bất kỳ của BOC, axetyl, hoặc butyryl, tác nhân axyl hóa là tác nhân bất kỳ trong số đi-tert-butylđicacbonat, anhyđrit axetic, và anhyđrit butyric và R1 là gốc béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cần hiểu rằng tác nhân axyl hóa được mô tả trên đây có thể được thay thế bằng nhiều loại tác nhân axyl hóa để tạo ra nhiều loại amin được bảo vệ axyl tương tự.

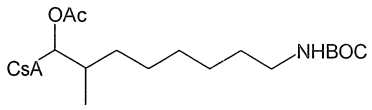
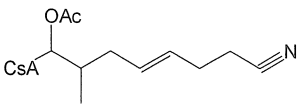
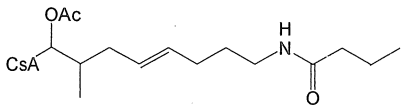
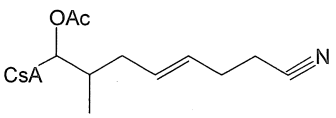
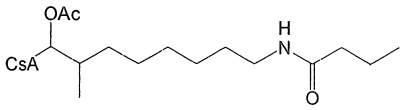
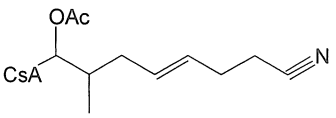
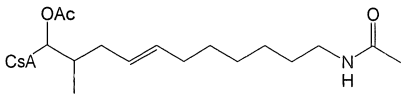
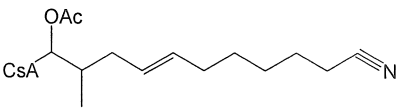
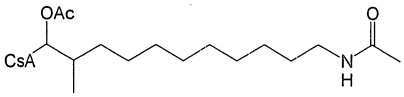
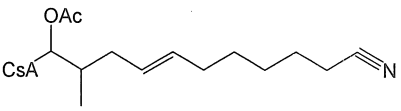
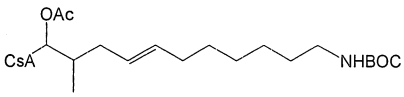
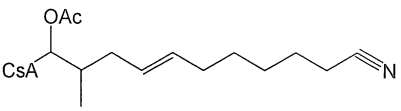
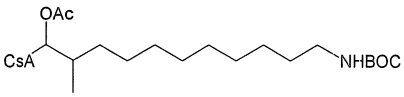
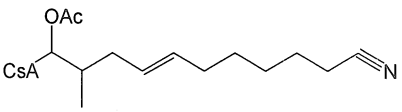
Ví dụ 6: Quy trình tổng hợp 420-08

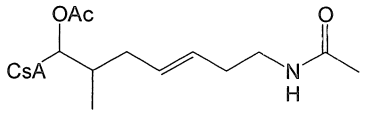
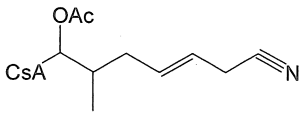
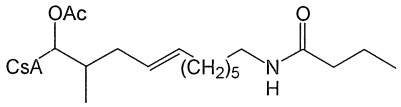
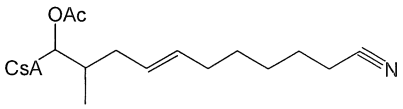
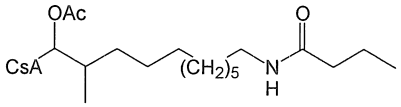
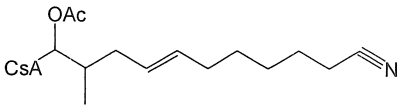


Để làm ví dụ minh họa, 404-187 (0,257mmol) được hòa tan trong 15ml metanol và được làm mát đến nhiệt độ 0°C. Đi-tert-butylđicacbonat (0,514mmol) và niken(II)clorua (0,025mmol) được cho thêm vào để tạo thành dung dịch trong suốt. Natribohyđrua (3.85mmol) được cho thêm thành từng phần vào trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp được tạo ra được khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Natribohyđrua (1,95mmol) được cho thêm vào ở nhiệt độ 0°C và khuấy tiếp tục trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. HPLC cho thấy hỗn hợp của 420-08-1 (hợp chất cacbamat) và 420-08-2 (hợp chất cacbamat có liên kết đôi được khử). Phản ứng được khuấy trong 30 phút với đietylentriamin (0,257mmol) và sau đó được cô trong chân không. Phần cặn được gom trong 75ml EtOAc, được rửa bằng 20ml dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Sử dụng phản ứng 6, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	Tác nhân bảo vệ	MS (Na^+)
420-08-1 	404-197 	đi-tert-butylđicacbonat	1410,0

420-08-2 	404-197 	đi-tert-butylđi-cacbonat	1412,1
420-107-1 	404-197 	anhyđrit butyric	1379,9
420-107-2 	404-197 	anhyđrit butyric	1382,1
420-109-1 	420-101 	anhyđrit axetic	1394,1
420-109-2 	420-101 	anhyđrit axetic	1396,1
420-110-1 	420-101 	đi-tert-butylđi-cacbonat	1452,1
420-110-2 	420-101 	đi-tert-butylđicacbonat	1454,1

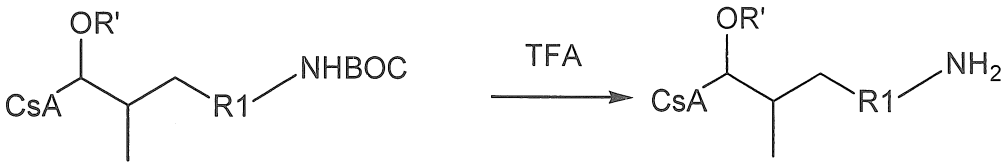
420-123 [1] 	420-89 	anhyđrit axetic	1337,9/13 39,9
420-128-1 	420-101 	anhyđrit butyric	1422,1
420-128-2 	420-101 	anhyđrit butyric	1424,1

[1] hỗn hợp không được phân tách

Khử nhóm chức bảo vệ amin

Amin được bảo vệ BOC (cacbamat) có thể được chuyển hóa thành amin tự do bằng cách thủy phân axit dùng axit trifloaxetic (TFA).

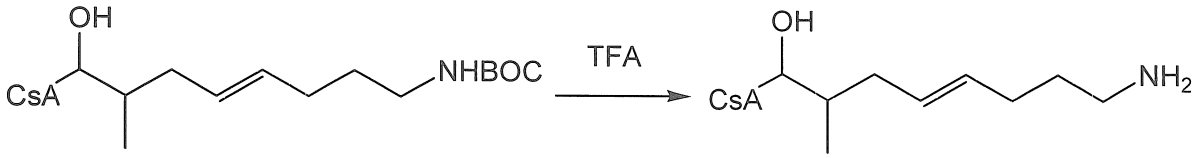
Phản ứng 7:



Công thức XX Công thức XXI

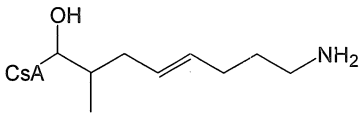
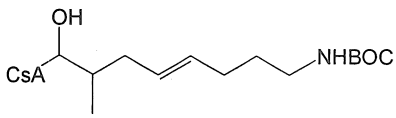
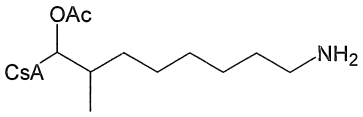
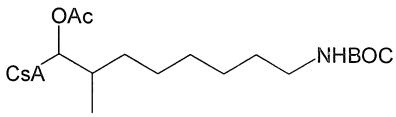
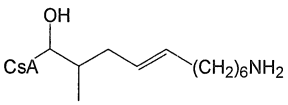
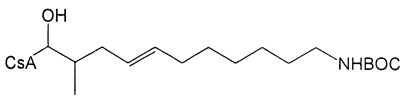
khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, và R` là H hoặc gốc axetyl.

Ví dụ 7: Quy trình tổng hợp 420-23



Để làm ví dụ minh họa, 420-17 (0,026mmol) được hòa tan trong 4ml DCM khan và 2ml axit trifloaxetic được cho thêm vào ở nhiệt độ 0°C. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. 20ml diclometan được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng H_2O và dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ và sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Sử dụng phản ứng 7, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

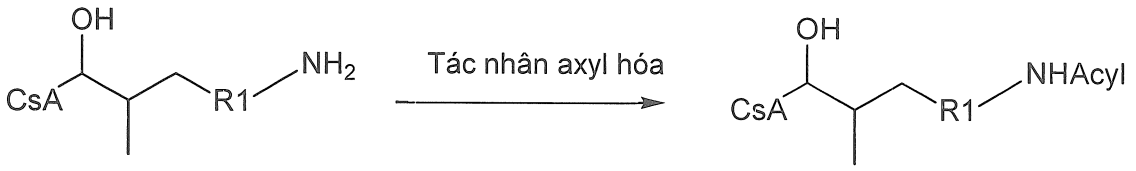
Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (M+1)
420-23 	420-17 	1246,0
420-25 	420-13 	1290,0
420-129 	420-120 	1288,0

Bảo vệ nhóm amino

Chức amino tự do có thể được bảo vệ bằng cách dùng nhiều loại nhóm bảo vệ sử dụng các phương pháp đã được xác lập. Nhiều tác nhân bảo vệ sẵn có so với quy

trình khử bắt đầu từ nitril. Các phản ứng 7 và 8 cùng với nhau tạo ra quy trình thay thế phản ứng 6 để điều chế các hợp chất amino được bảo vệ axyl.

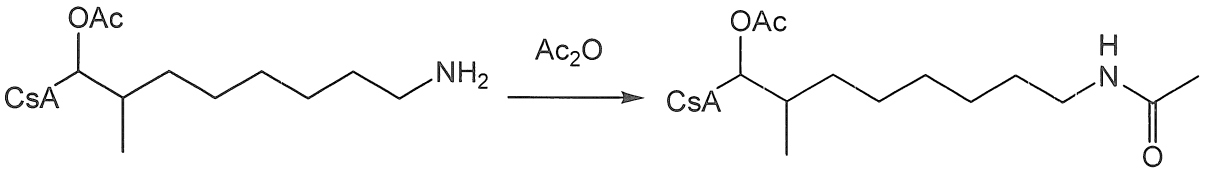
Phản ứng 8:



Công thức XXI Công thức XIV

Khi axyl là gốc bất kỳ của BOC, axetyl hoặc butyryl, tác nhân axyl hóa là tác nhân bất kỳ của đi-tert-butylđicacbonat, anhyđrit axetic, anhyđrit butyric, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng nhiều loại tác nhân axyl hóa bao gồm, đicacbonat, anhyđrit và axyl halogenua có thể được sử dụng để điều chế nhiều amin được bảo vệ axyl, và R1 là gốc béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa.

Ví dụ 8: Quy trình tổng hợp 420-27

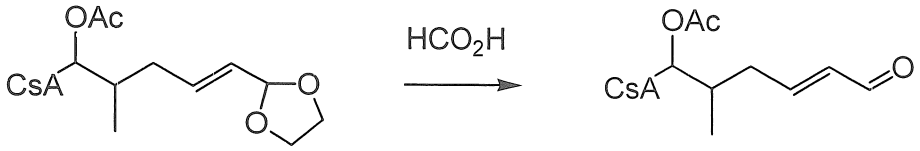


Để làm ví dụ minh họa, 420-25 (0,039mmol) được hòa tan trong 3ml pyridin khan trong môi trường nitơ. Phản ứng được làm mát đến nhiệt độ 0°C và anhyđrit axetic (0,59mmol) được cho thêm vào. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Dung môi được loại bỏ trong chân không và phần cặn được gom trong 25ml EtOAc. Phản ứng được rửa bằng 2 x 10ml HCl 1M, 2 x 10ml dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và 10ml nước muối và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không để tạo ra sản phẩm ở dạng chất rắn không màu.

Khử nhóm chức bảo vệ alđehyt

Gốc 1,3-đioxolan được chuyển hóa thành chức alđehyt bằng quy trình thủy phân axit.

Phản ứng 9 và ví dụ 9: Quy trình tổng hợp 404-47



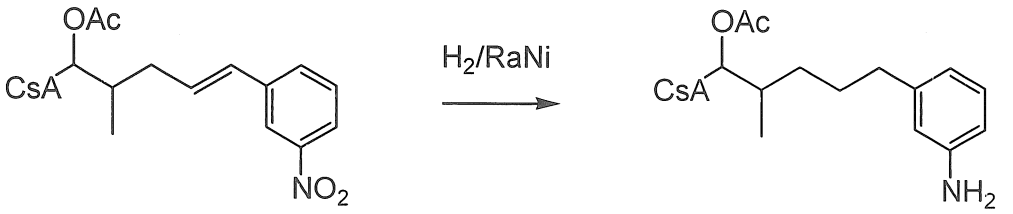
Công thức XVIII Công thức XIX

Để làm ví dụ minh họa, dung dịch của 404-33 (0,246mmol) trong 20ml axit formic được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. 100ml nước đá và 200ml dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa được cho thêm từ từ vào phản ứng (tạo bọt nhiều). Phản ứng được tách chiết bằng 2 x 150ml EtOAc. Các phần chiết kết hợp được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa, nước và nước muối và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ và sản phẩm được làm khô trong chân không.

Khử nhóm nitro

Hợp chất nitro thơm được khử thành anilin bằng quy trình hyđro hóa xúc tác. Phản ứng dẫn đến sự khử liên kết đôi.

Phản ứng 10 và ví dụ 10: Quy trình tổng hợp 404-120



Công thức XXII Công thức XXIII

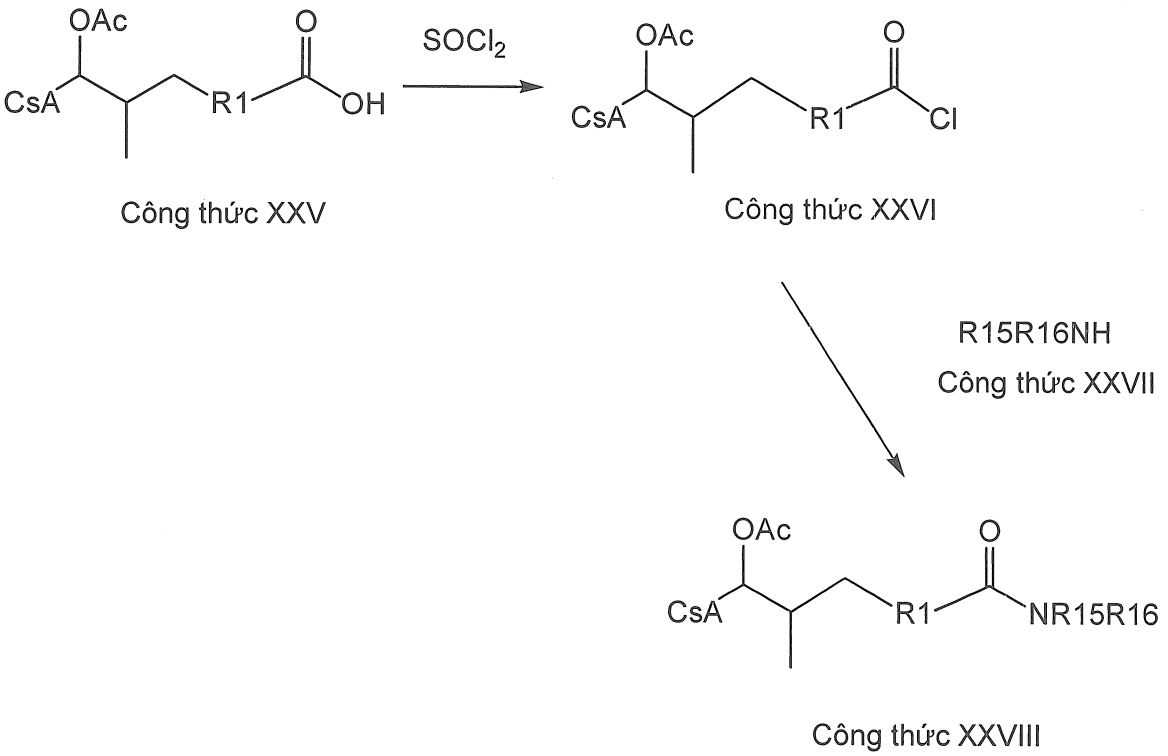
Để làm ví dụ minh họa, 404-89 (0,13mmol) được hòa tan trong 2ml etanol và niken Raney (0,18 g, 50% trong H_2O, được rửa 3 lần bằng etanol, tiếp đó được tạo huyền phù trong 2ml etanol) và 0,1ml axit axetic được cho thêm vào. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Phản ứng được lọc bằng Celite và bánh lọc được

rửa bằng metanol. Phần lọc được làm khô. Phần cặn được gom trong EtOAc, được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ và nước muối và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng silica gel (hexan/axeton 2:1).

Tổng hợp amit

Amit được điều chế từ axit cacboxylic bằng phản ứng của amin với axit clorua tương ứng (Phản ứng 11). Quy trình tổng hợp cũng có thể được thực hiện trực tiếp từ axit bằng cách sử dụng chất phản ứng ngẫu hợp phù hợp, ví dụ như DCC và HOBt (Phản ứng 12).

Phản ứng 11:



Công thức XXV

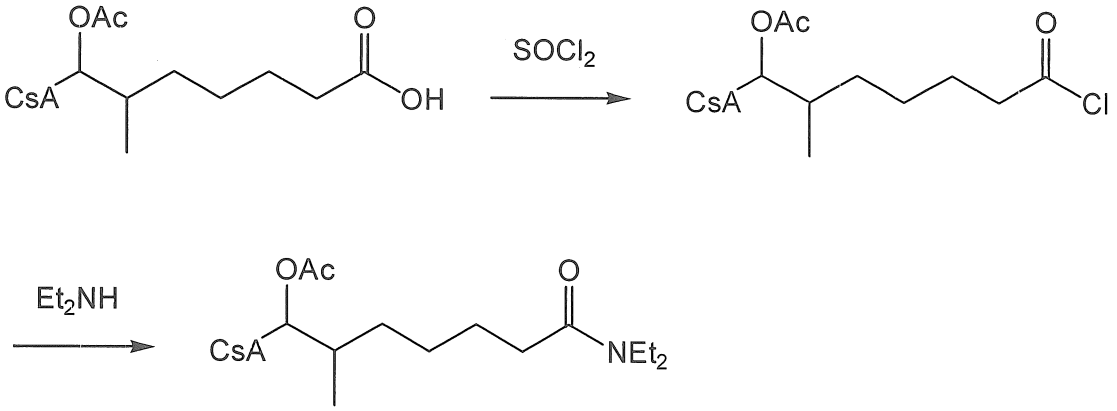
Công thức XXVI

Công thức XXVII

Công thức XXVIII

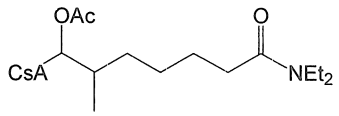
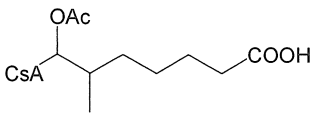
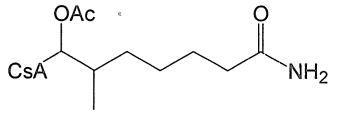
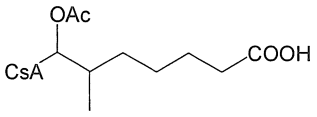
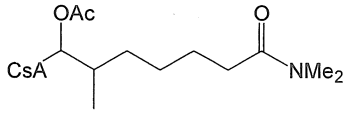
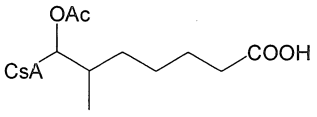
khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, R15 và R16 độc lập là hyđro hoặc mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, hoặc khi NR15R16 cùng nhau tạo thành gốc morpholinyl.

Ví dụ 11: Quy trình tổng hợp 404-85



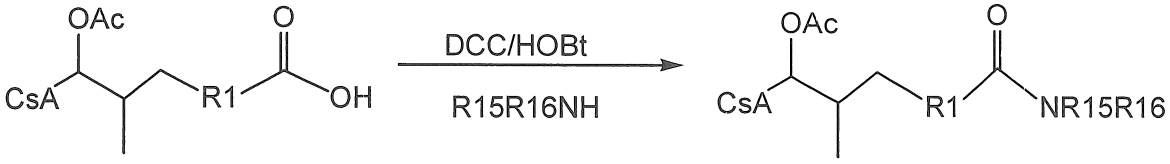
Để làm ví dụ minh họa, 365-73 (0,04mmol) và thionylclorua (68mmol) được kết hợp trong môi trường nitơ và được đun nóng đến nhiệt độ hồi lưu trong 2 giờ. Phản ứng được để nguội và được cô đến khô. 20ml toluen được cho thêm vào và phản ứng lại được cô đến khô (2 lần). Phần cặn được gom trong 5ml toluen khan và dietylamin (0,48mmol) được cho thêm vào. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. 5ml H_2O được cho thêm vào và hỗn hợp được chiết bằng 20ml EtOAc. Phần chiết được rửa bằng nước muối và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không và sản phẩm thô được tinh chế bằng silica gel (hexan/axeton 3:1).

Sử dụng phản ứng 11, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)	Amin
404-83 	365-73 	**1368,2**	đietylamin
404-128 	404-124 	1311,9	ammoniac khan [1]
404-129 	404-124 	1340,1	đimetyl-amin [2]

[1] trải qua phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ 0°C; [2] dung dịch 2M trong THF

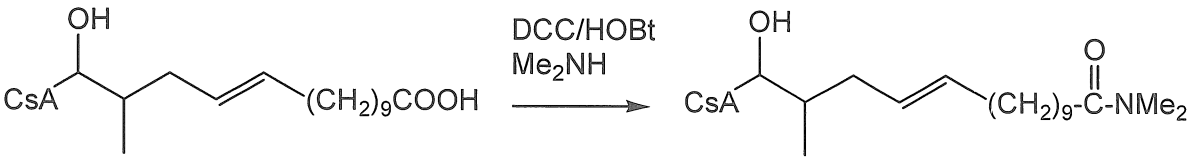
Phản ứng 12:



Công thức XXV Công thức XXVII Công thức XXVIII

khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, R15 và R16 độc lập là hydro hoặc mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, hoặc khi NR15R16 cùng nhau tạo thành gốc morpholinyl.

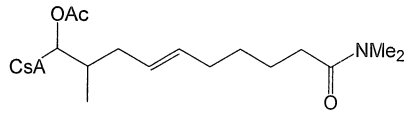
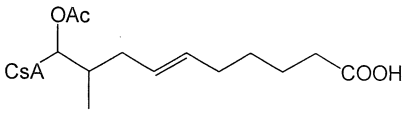
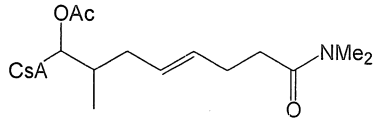
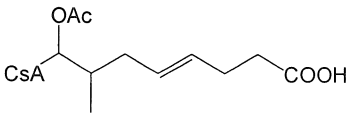
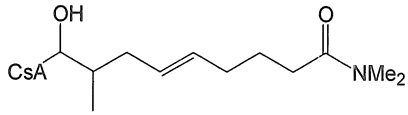
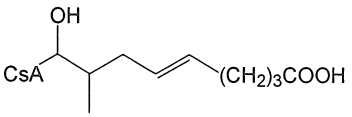
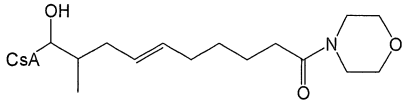
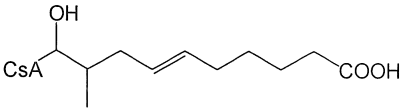
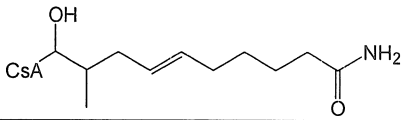
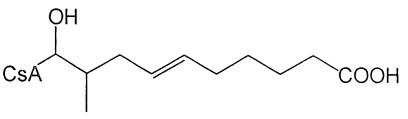
Ví dụ 12: Quy trình tổng hợp 420-104

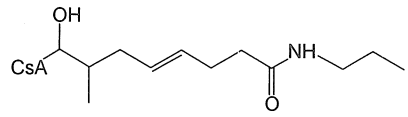
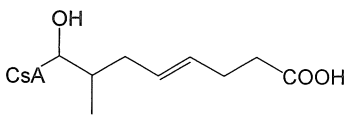
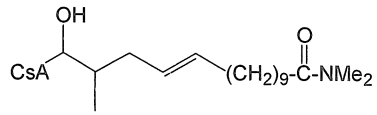
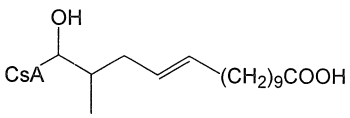
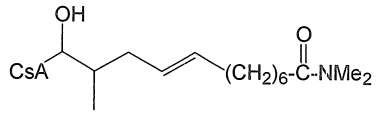
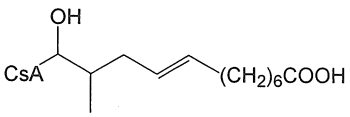
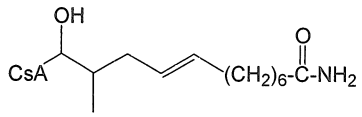
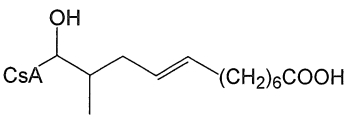


Để làm ví dụ minh họa, 420-98 (0,078mmol) được hòa tan trong 10ml DCM khan trong môi trường nitơ. Đixyclohexylcacbođiimit (DCC, 0,117mmol) và 1-

hydroxybenzotriazol hydrat (HOBt, 0,078mmol) được cho thêm vào ở nhiệt độ 0°C và hỗn hợp được khuấy trong 15 phút. Đimetylamin (0,78mmol) được cho thêm vào để tạo thành dung dịch trong suốt không màu. Bể làm nguội được lấy ra sau 15 phút và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 5 ngày. Phản ứng được chuyển sang phễu tách và 20ml DCM và 10ml HCl 0,5M được cho thêm vào. Lớp hữu cơ được thu lấy, được làm khô bằng Na_2SO_4 và được cô đến khô. Phần cặn được gom trong 10ml axetonitril. Chất không hòa tan được lọc ra và phần lọc được cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Sử dụng phản ứng 12, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)	Amin
404-150 	416-04 	1380,1	Đimetyl-amin [2]
404-155 	404-134 	1352,1	Đimetyl-amin [2]
404-156 	404-60 	1324,1	Đimetyl-amin [2]
404-162 	416-08 	1379,9	Morpholin
404-164 	416-08 	1309,8	amoniac khan [1]

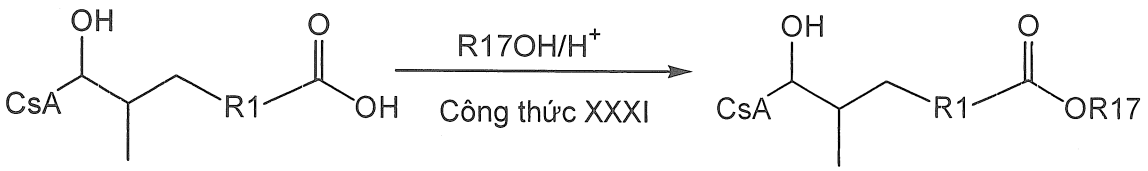
404-178 	404-137 	1323,9	Propylamin
420-104 	420-98 	1408,1	Đimetyl-amin [2]
420-114 	420-100 	1366,0	Đimetyl-amin [2]
420-121 	420-100 	1338,0	amoniac khan [1]

[1] trải qua phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ 0 °C; [2] dung dịch 2M trong THF

Este hóa

Este của axit cacboxylic được điều chế từ axit cacboxylic tương ứng và rượu bằng cách sử dụng xúc tác axit (Phản ứng 13) hoặc các tác nhân ngẫu hợp (DCC và DMAP, phản ứng 14).

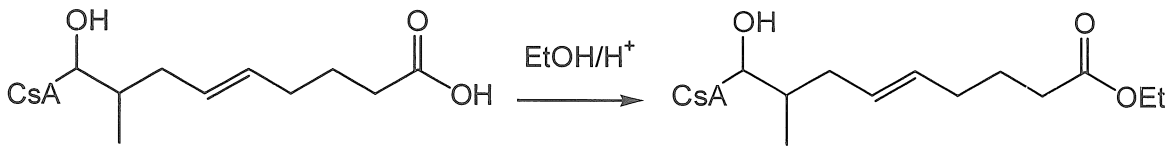
Phản ứng 13:



Công thức XXIV Công thức XXXII

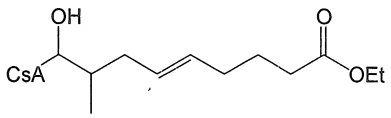
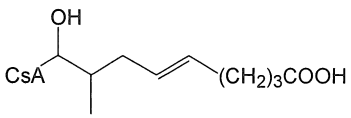
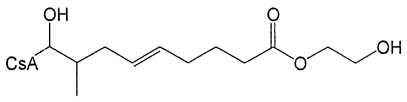
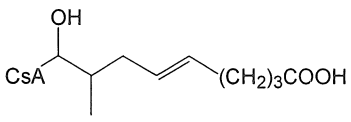
khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, và R17 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa halogen hoặc phần tử thế hyđroxyl.

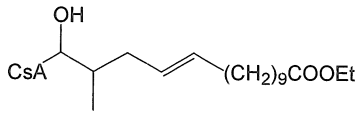
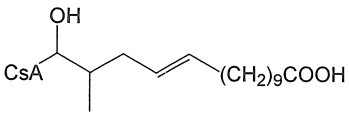
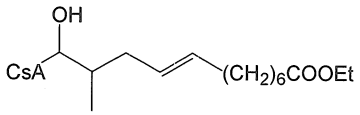
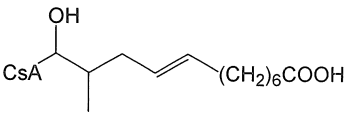
Ví dụ 13: Quy trình tổng hợp 404-171



Để làm ví dụ minh họa, hỗn hợp của 404-60 (0,059mmol), 4ml EtOH và 2µl H_2SO_4 đậm đặc được đun nóng đến nhiệt độ hồi lưu trong 4 giờ. Dung môi được làm bay hơi và phần cặn được gom trong axetonitril. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

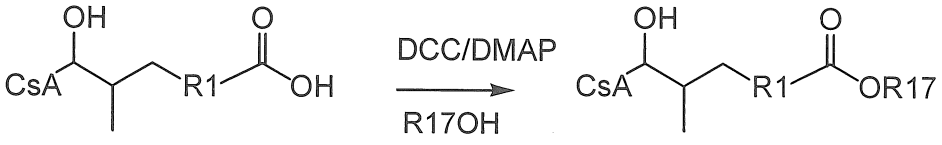
Sử dụng phản ứng 13, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)	Tác nhân phản ứng
404-171 	404-60 	1368,2	etanol
404-182 	404-60 	1311,9	etylen glycol [1]

420-103 	420-98 	1409,1	etanol
420-113 	420-100 	1366,9	etanol

[1] 3 giờ ở nhiệt độ 90°C; sản phẩm được chiết tách bằng EtOAc

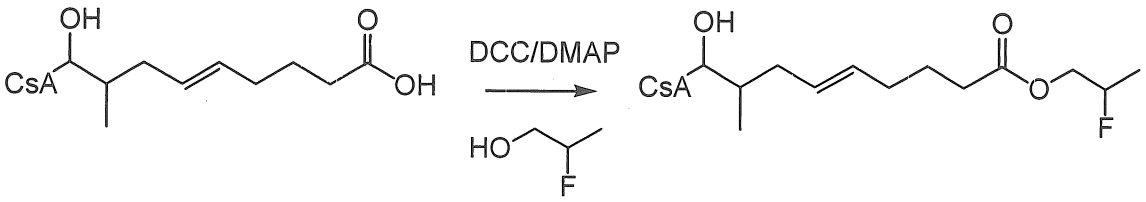
Phản ứng 14:



Công thức XXIV Công thức XXXI Công thức XXXII

khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, và R17 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, tùy ý chứa halogen hoặc phần tử thế hyđroxyl.

Ví dụ 14: 420-24



Để làm ví dụ minh họa, 404-60 (0,053mmol) được hòa tan trong 4ml DCM khan và được làm nguội đến 0°C trong môi trường nitơ. Đimetylaminopyridin (DMAP, 0,005mmol), 2-flopropanol (0,27mmol) và đixyclohexylcacbođiimit (DCC, 0,058mmol) được cho thêm vào và phản ứng được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ 0°C. Bể làm lạnh được lấy ra và tiếp tục khuấy qua đêm ở nhiệt độ môi trường. 20ml DCM

được cho thêm vào, tiếp đó phản ứng được rửa bằng H_2O và được làm bay hơi đến khô. Phần cặn được gom trong 10ml axetonitril và được lọc. Phần lọc được cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Rượu

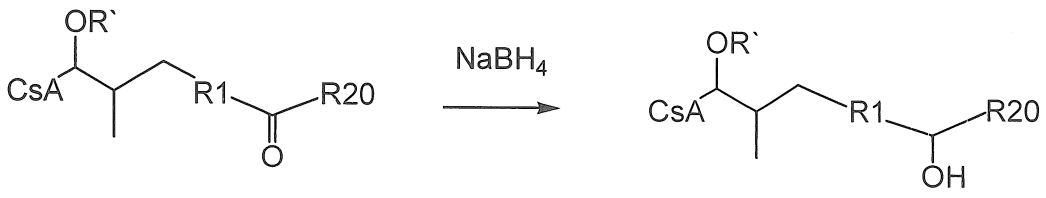
Ngoài quy trình tổng hợp trực tiếp trong phản ứng Wittig, các rượu thu được bằng nhiều phản ứng. Khử gốc cacbonyl bằng natri bohyđrua dẫn đến rượu bậc 1 (bắt đầu từ aldehyt) hoặc rượu bậc hai (bắt đầu từ keton), lần lượt.

Oxy hóa liên kết đôi bằng phương pháp tạo hữu cơ-boran có thể dẫn đến hỗn hợp của các chất đồng phân. Phản ứng tiến hành chủ yếu theo hướng ngược-Markovnikov. Trong trường hợp của olefin cuối mạch, rượu bậc một là sản phẩm chính.

Olefin có thể được chuyển hóa thành điol bằng quy trình oxy hóa bằng hyđro peroxit.

Phản ứng của hợp chất cacbonyl với chất phản ứng Grignard dẫn đến rượu bậc hai (bắt đầu từ alđehyt) và rượu bậc ba (bắt đầu từ keton). Phương pháp này cho phép kéo dài mạch cacbon.

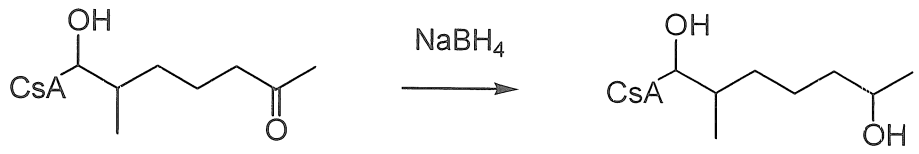
Phản ứng 15:



Công thức XXXV Công thức XXXVI

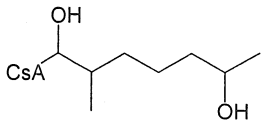
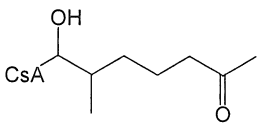
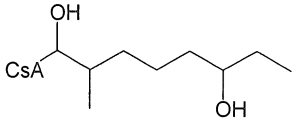
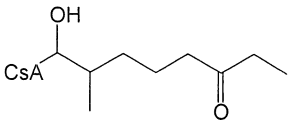
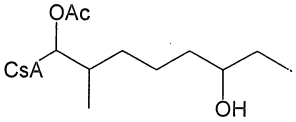
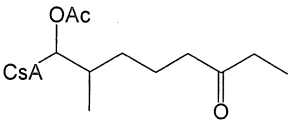
khi R' là H hoặc axetyl, R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, và R20 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa.

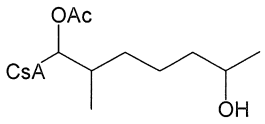
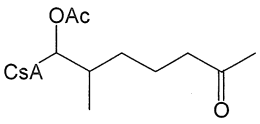
Ví dụ 15: Quy trình tổng hợp 404-98



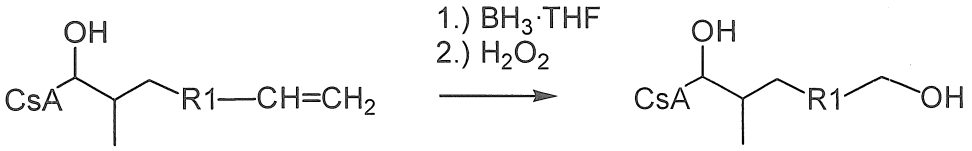
Để làm ví dụ minh họa, 404-61 (0,0365mmol) được hòa tan trong 4,5ml EtOH khan trong môi trường nitơ. Natri bohyđrua (0,15mmol, được tạo huyền phù trong 0,5ml EtOH khan) được cho thêm vào ở nhiệt độ 0°C và hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Natri bohyđrua (0,08mmol) bổ sung được cho thêm vào và tiếp tục khuấy qua đêm. Phản ứng được dập tắt bằng 5ml HCl 1M trong điều kiện làm lạnh bằng bể nước đá và được chiết bằng EtOAc. Phần chiết được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng Na_2SO_4 và được cô đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Sử dụng phản ứng 15, các hợp chất sau đây là các ví dụ khác nữa của các hợp chất mà có thể được tổng hợp.

Hợp chất	Nguyên liệu ban đầu	MS (Na^+)
404-98	404-61	1256,9
		
404-195	404-173	1271,0
		
404-198	404-172	1313,0
		

420-09	404-56	1298,9
		

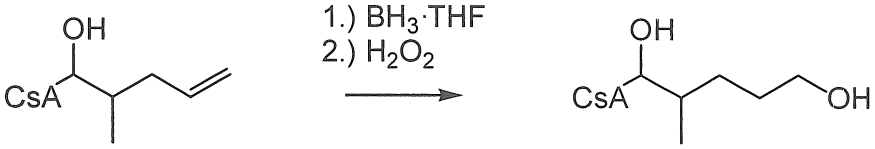
Phản ứng 16:



Công thức XXVIII Công thức XXIX

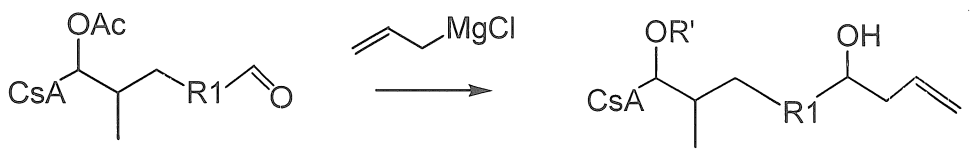
khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa.

Ví dụ 16: Quy trình tổng hợp 420-28-1



Để làm ví dụ minh họa, 404-16 (0,081mmol) được hòa tan trong môi trường nitơ trong 4ml THF khan. Phản ứng được để nguội đến 0°C và BH_3·THF (dung dịch 1M trong THF, 0,06mmol) được cho thêm vào. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. HPLC cho thấy phản ứng không hoàn toàn. BH_3·THF (0,5mmol) thêm được cho thêm vào và khuấy tiếp tục trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được để nguội đến 0°C và 1,0ml NaOH 1M và 0,30ml dung dịch hyđro peroxit 30% được cho thêm vào. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Phản ứng được chiết tách bằng 25ml EtOAc. Phần chiết được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng Na_2SO_4 và được cô đến khô. Sản phẩm được tinh chế bằng HPLC điều chế.

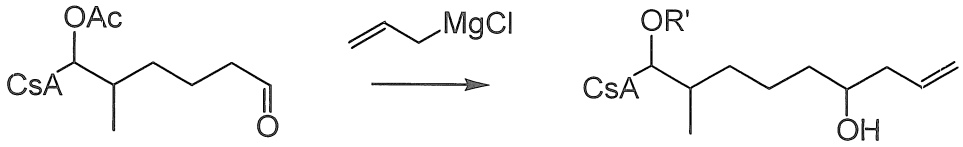
Phản ứng 17:



Công thức XLI Công thức XLIII

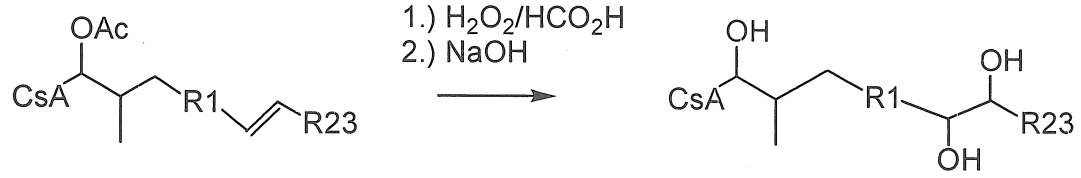
khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, R' là H hoặc gốc axetyl.

Ví dụ 17: Quy trình tổng hợp 420-49



Để làm ví dụ minh họa, 420-49 (0,037mmol) được hòa tan trong 5ml THF khan trong môi trường argon. Phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ -70°C và allylmagie clorua (1M dung dịch trong THF, 0,22mmol) được cho thêm vào. Phản ứng được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ -70°C và tiếp đó được để đến nhiệt độ phòng. Sau 90 phút phản ứng được dập tắt bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa. Phản ứng được chiết tách bằng 25ml EtOAc. Phần chiết được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng Na_2SO_4 và được cô đến khô. Sản phẩm được tinh chế bằng HPLC điều chế. Thu được hỗn hợp của hợp chất được axetyl hóa và khử axetyl hóa.

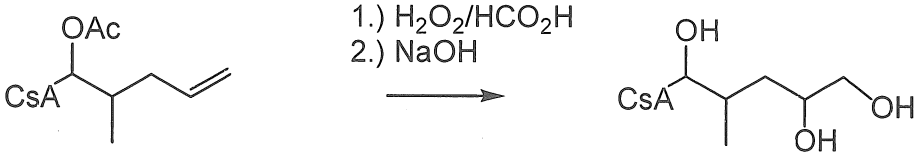
Phản ứng 18:



Công thức XLV Công thức XLVI

khi R1 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa, và R23 là mạch béo, thẳng hoặc nhánh, bão hòa hoặc không bão hòa.

Ví dụ 18: Quy trình tổng hợp 404-126

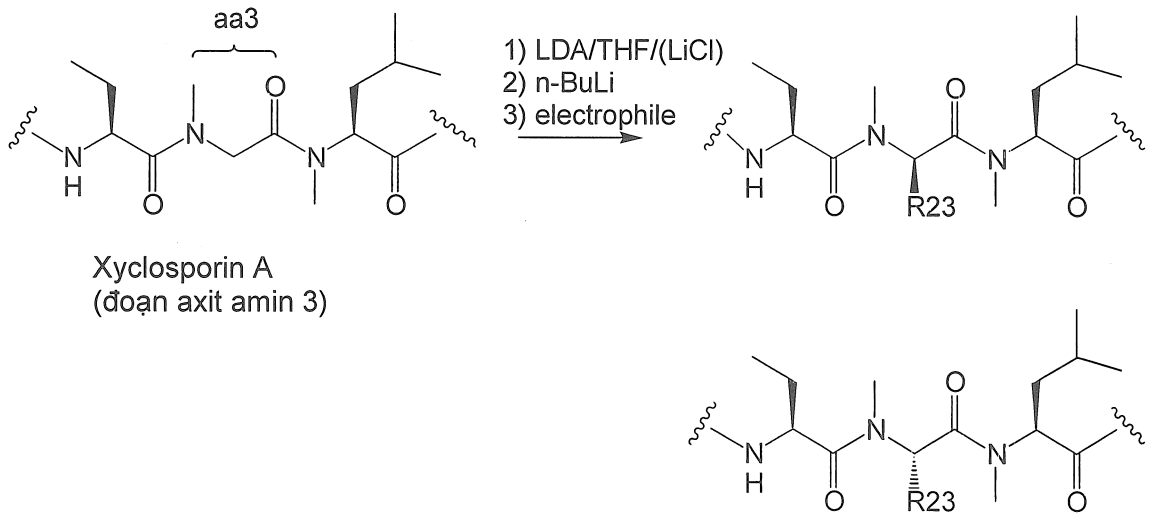


Để làm ví dụ minh họa, 404-16 (0,054mmol) được hòa tan trong 1ml axit formic và hydro peroxit (dung dịch 30%, 0,52mmol) được cho thêm vào. Phản ứng

được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và sau đó được cô đến khô. Phần cặn được hòa tan trong 25mL EtOAc, được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không. Phản ứng được gom trong 9ml THF và 3ml NaOH 1M, và được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung môi được loại bỏ và phần cặn được phân tách giữa 25ml EtOAc và 5ml H_2O. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối và được làm khô bằng Na_2SO_4. Dung môi được làm bay hơi và sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Ví dụ 19: Cải biến axit amin 3

CsA trải qua sự thế trên AA3 như được trình bày dưới đây. Phản ứng với lượng dư LDA (lithi điisopropylamit) dẫn đến một dẫn xuất hexalithio chứa bốn thành phần lithi azaenolat cũng như là một thành phần lithi alkoxit trên mạch bên của axit amin 1 và một thành phần lithi enolat trên AA3, tương ứng. Phản ứng tiếp theo với một chất ái điện tử thích hợp tạo ra các sản phẩm thế trên phần AA3 (sarcosin). Các chất ái điện tử thích hợp, ví dụ như các alkyl halogenua, alđehyt, cacbon đioxit và alkyl đisulfit (Bảng 1). Có thể thu được cả hai epime D và L, với tỉ lệ tương ứng phụ thuộc vào các điều kiện phản ứng. Con đường A (xem dưới đây) tạo ra chủ yếu sản phẩm D, trong khi con đường B (thêm lượng dư LiCl) tạo ra hỗn hợp cả hai epime.



Xyclosporin A
(đoạn axit amin 3)

Ví dụ 19: Phản ứng thế tại AA3 của Xyclosporin A. Thu được các chất đồng phân lập thể D và L.

Con đường A: [D-MeSar]^3-CsA

Một bình thót cổ đã sấy khô trong lò được nạp 160mL THF khan và điisopropylamin (2,07mL, 14,8mmol) trong môi trường argon. Dung dịch này được làm lạnh đến -78 °C và n-butyl lithi (2,5M trong hexan, 5,4mL, 13,5mmol) được bổ sung vào. Sau khi khuấy trong 30 phút, CsA (2,40g, 2,0mmol, được hòa tan trong 40mL THF khan) được bổ sung vào. Phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở -78°C. n-butyl lithi bổ sung (3,2mL, 8,0mmol) được thêm vào, sau đó bổ sung metyl iođua (1,25mL, 20,0mmol). Tiếp tục khuấy ở -78 °C trong 1,5 giờ, và sau đó phản ứng được làm ấm lên đến nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ nữa. 20mL H_2O được thêm vào và THF được loại bỏ trong chân không. 50mL H_2O nữa được bổ sung và thực hiện chiết hỗn hợp bằng 150mL EtOAc. Phần chiết được rửa với nước muối và được sấy khô trên Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không và sản phẩm thô được tinh chế trên silica gel (hexan/axeton 3:1). Hiệu suất: 0,74g (0,61mmol, 30 %).

Con đường B: [MeSar]^3-CsA

Một bình thót cổ khô 100mL được nạp 7,5mL THF khan và điisopropylamin (0,46mL, 3,3mmol) trong môi trường argon. Dung dịch này được làm lạnh đến 0°C và n-butyl lithi (1,32mL, dung dịch 2,5M trong hexan, 3,3mmol) được thêm vào. Phản ứng được khuấy trong 20 phút ở 0°C và sau đó được làm lạnh đến -78°C. Dung dịch chứa CsA (601mg, 0,5mmol) và lithi clorua (636mg, 15mmol) trong 12mL THF khan được chuẩn bị và làm lạnh đến -78°C trong môi trường argon. Dung dịch LDA sau đó được chuyển vào hỗn hợp này nhờ một ống thông. Phản ứng này được khuấy ở -78°C trong 2 giờ. n-butyl lithi bổ sung (1,20mL, 3,0mmol) được thêm vào, sau đó là metyl iođua (0,62mL, 10mmol). Hỗn hợp được làm ấm lên -20°C và được khuấy ở nhiệt độ này trong 3 giờ. Phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ phòng, được dập tắt bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa, được chiết bằng EtOAc (2 x 20mL), được rửa với nước muối và được sấy khô trên Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không và sản phẩm thô được tinh chế trên silica gel (hexan/axeton 3:1). Hiệu suất: [L-MeAla^3]-CsA: 302mg (0,25mmol, 50%). [D-MeAla^3]-CsA: 76mg (0,06mmol, 12%).

Bảng 1: Ví dụ về các chất ái điện tử có thể được sử dụng trong phản ứng alkyl hóa vị trí 3 của xyclosporin.

Chất ái điện tử	R23 [1]	Con đường	Ghi chú
metyl iođua	$-CH_3$	A/B	-
etyl iođua	$-CH_2CH_3$	A/B	-
allyl bromua	$-CH_2CHCH_2$	B	-
1,3-điiođopropan	$-CH_2CH_2CH_2I$	B	-
1,4-điiođobutan	$-(CH_2)_3CH_2I$	B	-
trimetylamonium-3-iođopropan hexaflophosphat	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	B	-
propargyl bromua	$-CH_2CCH$	A	10 đương lượng chất ái điện tử; được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ sau khi thêm chất ái điện tử
tert-butyl bromoaxetat	$-CH_2CO_2$(t-Bu)	A	5 đương lượng chất ái điện tử; được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ sau khi thêm chất ái điện tử
benzyl bromua	$-CH_2Ph$ [2]	A	15 đương lượng LDA và 30 đương lượng chất ái điện tử; được khuấy trong 6 giờ ở -75 °C và 10 giờ ở nhiệt độ phòng sau khi thêm chất ái điện tử
formalđehyt	$-CH_2OH$	A	formalđehyt được chuẩn bị từ paraformalđehyt ở 170°C trước khi thêm
axetalđehyt	$-CH(OH)CH_3$	B	được khuấy trong 2,5 giờ ở -78°C sau khi thêm chất ái điện tử

pivalalđehyt	—CH(OH)(t-Bu) [3]	B	được khuấy trong 70 phút ở -78°C sau khi thêm chất ái điện tử
benzalđehyt	—CH(OH)Ph	B	được khuấy trong 2,5 giờ ở -78°C sau khi thêm chất ái điện tử
cacbon đioxit	—COOH	A	khí CO_2 gas đi qua phản ứng trong 15 phút ở -78°C; được khuấy trong 1 giờ ở -78°C sau khi thêm chất ái điện tử
đimetyl đisulfit	—SCH_3	B	được khuấy trong 18 giờ ở 0°C sau khi thêm chất ái điện tử
p-tolyl đisulfit	—S(p-Tol) [4]	B	được khuấy trong 18 giờ ở 0°C sau khi thêm chất ái điện tử

[1] theo ví dụ 19; [2] Ph = phenyl; [3] t-Bu = tert-butyl; [4] Tol = tolyl.

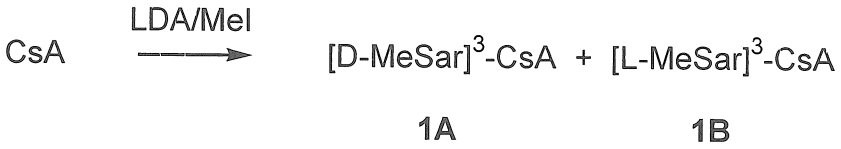
Các ví dụ 20 và 21, được trình bày dưới đây, là các ví dụ chung về các phản ứng hóa học có thể để tổng hợp các hợp chất mong muốn được cải biến tại axit amin 1 và 3 của CsA bằng cách sử dụng các thuốc thử có các tính chất hóa học cần thiết, và nó sẽ được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng sự thay thế của một số chất phản ứng có thể được thực hiện.

Ví dụ 20: Sự cải biến AA1 CsA được alkyl hóa

Ví dụ 20 cung cấp một con đường tổng hợp để đưa các phần tử thế vào vị trí 3 của CsA trước khi cải biến mạch bên AA1. Sau sự alkyl hóa ở vị trí 3 (3-alkylation), quy trình bước 2 tạo ra alđehyt được axetyl hóa (hợp chất **3** trong ví dụ dưới đây), chất này là một chất nền thích hợp để cải biến ở vị trí 1 qua phản ứng Wittig. Phương pháp này cho phép đưa các phần vào mạch bên AA1 có sự ổn định hạn chế theo các điều kiện phản ứng được sử dụng trong các bước 1-3, chẳng hạn bazơ mạnh hoặc các chất oxy hóa.

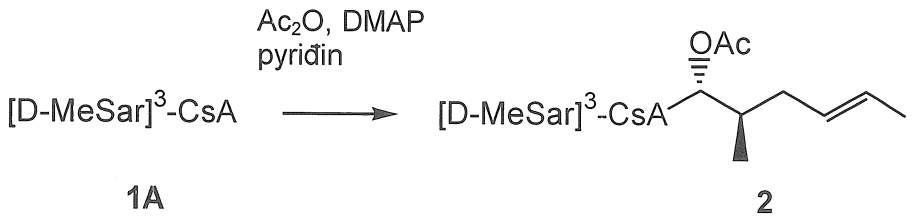
Các ví dụ tiếp theo về các hợp chất được điều chế bằng cách sử dụng trình tự này được tóm tắt trong Bảng 2.

Bước 1: Alkyl hóa mạch bên AA3



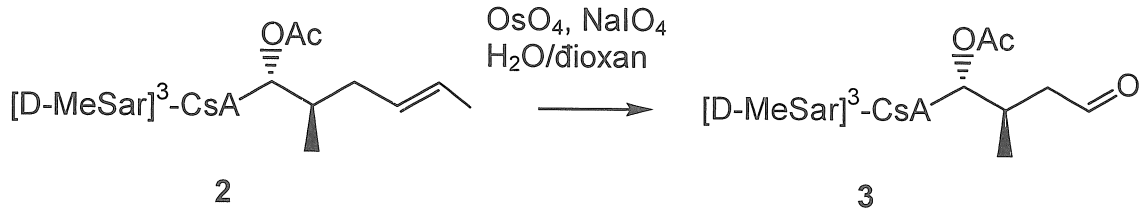
Quá trình tổng hợp được thực hiện theo con đường A hoặc B, tương ứng, như được mô tả ở trên.

Bước 2: Axetyl hóa nhóm hyđroxy trên mạch bên AA1



Một bình thót cổ đã làm khô trong lò được nạp, trong môi trường nitơ, [D-MeSar]^3-CsA (1,84g, 1,51mmol), N,N-đimetylaminopyriđin (19mg, 0,15mmol) và 20mL pyriđin khan, sau đó là anhyđrit axetic (10mL, 0,1mol). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Hỗn hợp được rót vào 100mL nước đá và được khuấy cho đến khi tất cả đá tan ra. Chất rắn được thu hồi bằng cách lọc và được làm khô trong không khí. Chất rắn được hòa tan trong 50mL EtOAc và được rửa bằng HCl 1M (2 lần), dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và nước muối. Pha hữu cơ được sấy khô trên Na_2SO_4 và được làm bay hơi. Sản phẩm thô được tinh chế trên silica gel (hexan/EtOAc/MeOH 10:10:0,5).

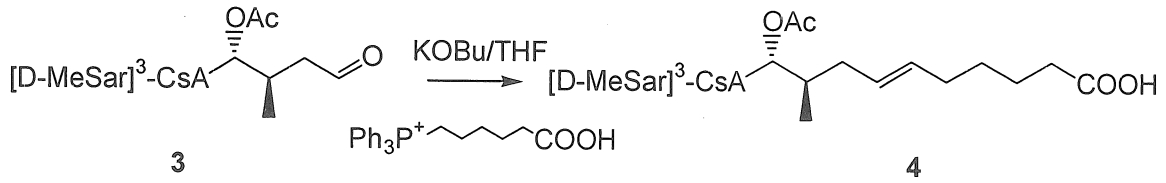
Bước 3: Sự tạo thành alđehyt



2 3

Bình thót cổ chứa hợp chất **2** (800mg, 0,636mmol) được bổ sung 10mL đioxan và 10mL H_2O. $NaIO_4$ (544mg, 2,54mmol) và OsO_4 (dung dịch 7,9mM trong nước/đioxan 1:1, 4,05mL, 32mmol) được bổ sung vào và phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. 75mL H_2O được thêm vào và phản ứng được chiết bằng 3 x 25mL EtOAc. Các phần chiết được rửa với nước, dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa, nước và nước muối (mỗi loại 25mL) và được sấy khô trên $MgSO_4$. Dung môi được loại bỏ trong chân không và sản phẩm thô được tinh chế silica gel (hexan/EtOAc 3:1).

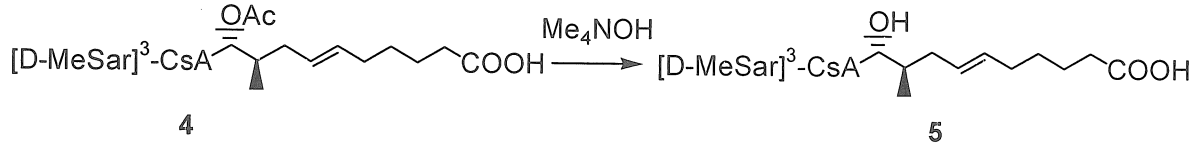
Bước 4: Phản ứng Wittig



3 4

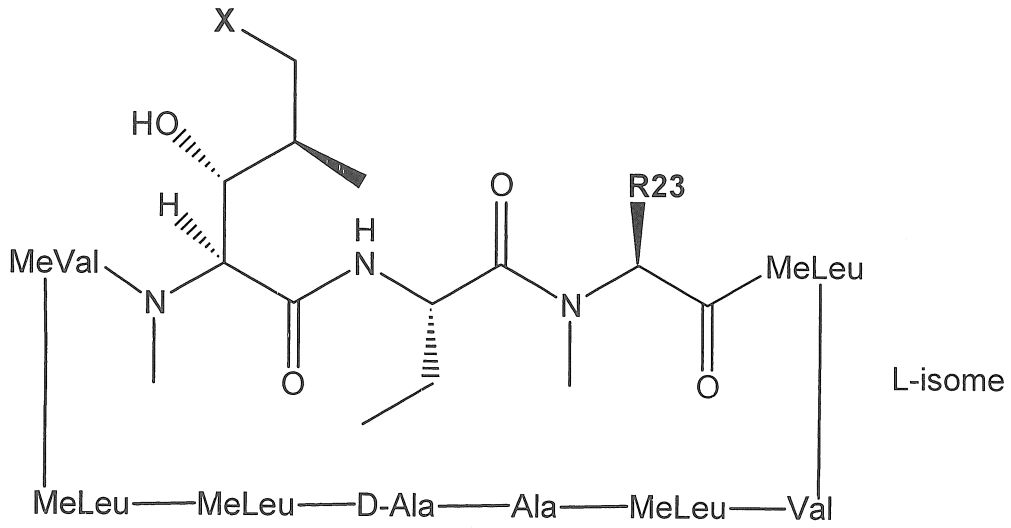
Một bình thót cổ đã sấy khô trong lò được nạp axit triphenyl-6-hexanoic phosphoni bromua (90mg, 0,195mmol) và 5mL THF khan trong môi trường argon. Kali t-butoxit (dung dịch 1M trong THF, 0,39mL, 0,39mmol) được thêm vào ở 0°C và dung dịch được khuấy trong 30 phút để tạo ra dung dịch màu cam sáng. Hợp chất **3** (81mg, 0,065mmol, được hòa tan trong 1mL THF khan) được thêm từng giọt vào phản ứng và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Phản ứng được dập tắt bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa và được chiết bằng EtOAc. Phần chiết được rửa bằng nước muối và được làm khô trên Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không và sản phẩm thô được tinh chế trên silica gel (toluen/axeton 3:1).

Bước 5: Loại axetyl

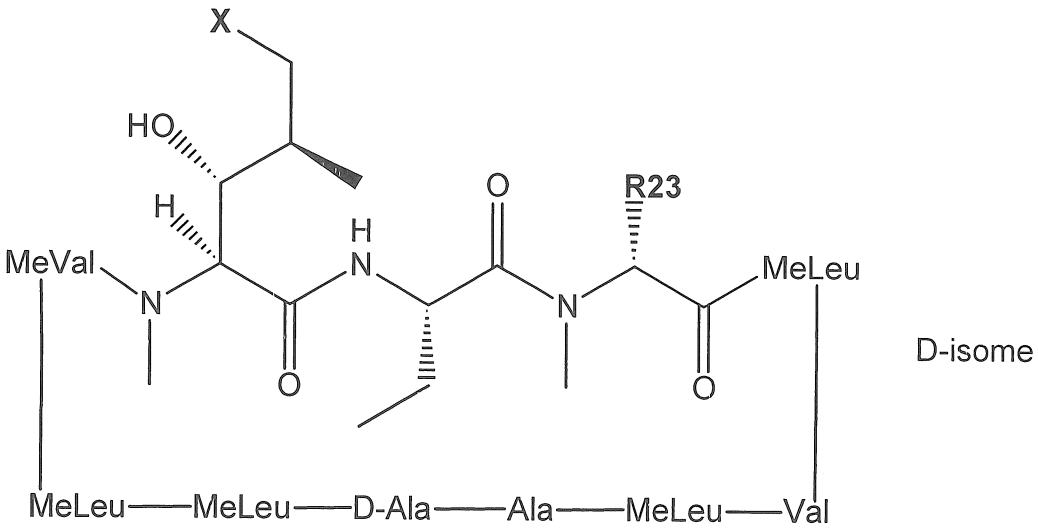


4 5

Hợp chất 4 (30mg, 0,022mmol) được hòa tan trong 2mL metanol và 0,5mL nước và tetrametylamoni hyđroxit pentahyđrat (12mg, 0,066mmol) được thêm vào. Phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong vài ngày cho đến khi HPLC xác định rằng sự loại nhóm bảo vệ là hoàn toàn. Phản ứng này được axit hóa đến pH 2 bằng HCl 1M và được cô đặc trong chân không. Phần cặn được hấp thụ vào EtOAc, được rửa với nước và sấy khô trên Na_2SO_4. Dung môi được làm bay hơi và sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.



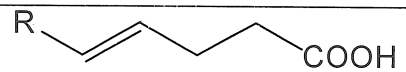
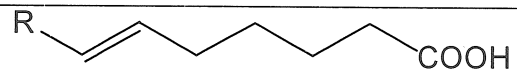
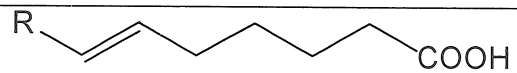
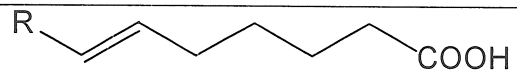
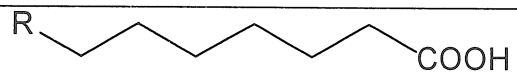
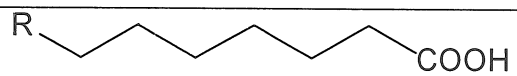
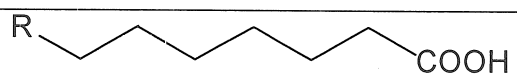
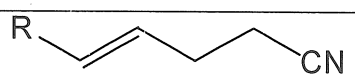
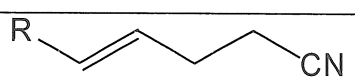
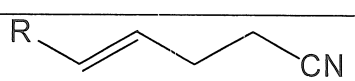
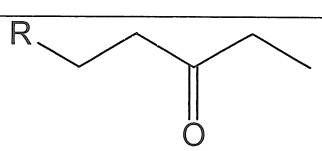
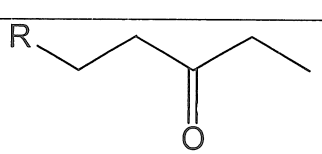
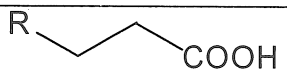
L-isome

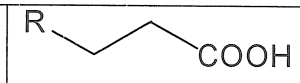
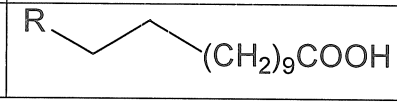


D-isome

Sơ đồ biểu diễn các dẫn xuất Xyclosporin được cải biến 1,3.

Bằng cách sử dụng phương pháp ở ví dụ 20, các hợp chất sau là các ví dụ tiếp theo về các hợp chất có thể được tổng hợp (X và Y có liên quan tới sơ đồ biểu diễn ở trên; và sự tham chiếu R trong X là để chỉ ra sự gắn cấu trúc vào AA1 của CsA).

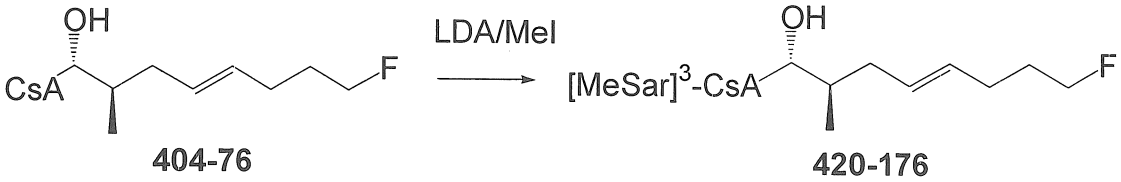
Hợp chất	X	R23	Đồng phân	MS (Na^+)
431-13		$-CH_3$	L	1296,8
414-64		$-CH_3$	D	1325,0
431-19		$-CH_3$	L	1324,8
431-40		$-CH_2CH_3$	D	1338,8
440-02		$-CH_3$	D	1327,1
431-20		$-CH_3$	L	1326,9
440-13		$-CH_2CH_3$	D	1341,1
431-21		$-CH_3$	D	1277,9
431-44		$-CH_2CH_3$	L	1291,9
440-14		$-CH_2CH_3$	D	1292,0
431-136		$-CH_3$	L	1283,1
440-24		$-CH_3$	D	1283,1
440-10-1		$-CH_3$	D	1270,9

440-22-1		$-CH_2CH_3$	D	1285,0
440-20		$-CH_3$	D	1397,2

Alkyl hóa các hợp chất được cải biến AA1

Phản ứng 21 đưa các phần tử thế vào phần AA3 của các hợp chất đã được cải biến trước đây trên mạch bên AA1. Ngoài các nhóm có sẵn thông qua phản ứng 19, con đường này cho phép đưa các phần tử thế ở AA3 không bền dưới các điều kiện phản ứng được sử dụng trong phản ứng 20, ví dụ phần thiometyl có thể trải qua sự oxy hóa trong suốt quá trình tạo thành alđehyt trong bước 3 của phương pháp này.

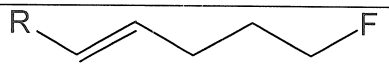
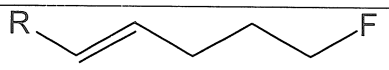
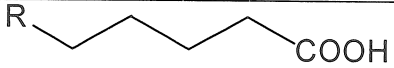
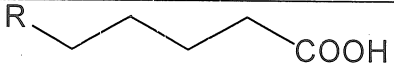
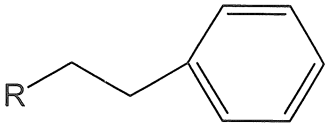
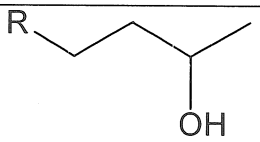
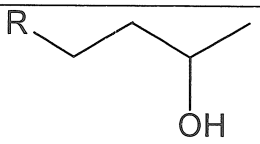
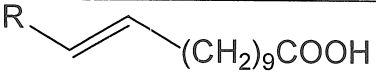
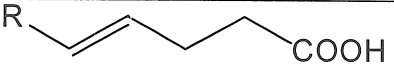
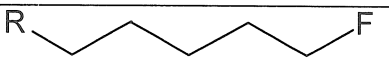
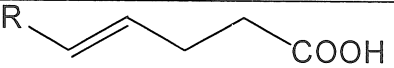
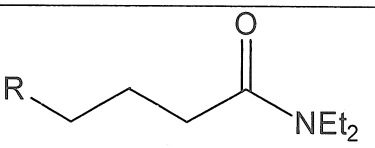
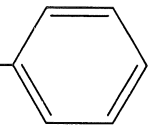
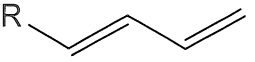
Ví dụ 21



404-76 **420-176**

Một bình phản ứng khô 25mL được nạp 1,5mL THF khan và điisopropylamin (87µL, 0,62mmol) trong môi trường argon. Dung dịch được làm lạnh đến 0°C và n-butyl lithi (2,5M trong hexan, 0,25mL, 0,62mmol) được thêm vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 20 phút ở 0°C và sau đó được làm lạnh đến -70°C. Dung dịch trong suốt LDA được chuyển vào dung dịch chứa hợp chất 404-76 (118mg, 0,095mmol) và lithi clorua (120mg, 2,84mmol) trong 1,5mL THF khan ở -70°C. Tiếp tục khuấy hỗn hợp trong 2 giờ ở -70°C. Lượng n-butyl lithi bổ sung (0,23mL, 0,58mmol) được thêm vào, sau đó là metyl iođua (118µL, 1,89mmol). Phản ứng được làm ấm lên -20°C và được giữ ở nhiệt độ này qua đêm. Phản ứng được dập tắt bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa và được chiết bằng EtOAc. Phần chiết được rửa bằng nước muối, được sấy khô trên Na_2SO_4 và được làm bay hơi đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế trên silica gel (hexan/axeton 3:1 → 2:1).

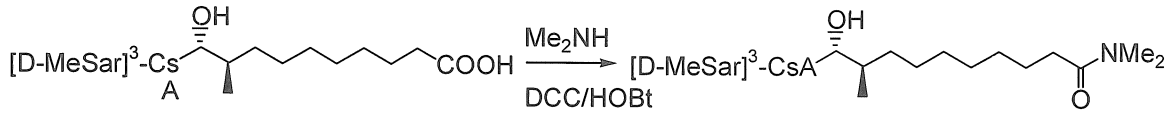
Bảng 3: Ví dụ về các hợp chất được điều chế bằng phương pháp 21 (X và Y theo Fig. 3; và sự tham chiếu R trong X để chỉ ra sự gắn cấu trúc vào AA1 của CsA).

Hợp chất	X	R23	Đồng phân	MS (Na^+)
420-176-1		$-CH_3$	D	1284.9
420-176-2		$-CH_3$	L	1284.9
420-177-1		$-CH_3$	D	1298.8
420-177-2		$-CH_3$	L	1298.8
420-180-1		$-CH_3$	D	1302.8
420-182-1		$-CH_3$	D	1270.8
420-182-2		$-CH_3$	L	1270.8
420-186		$-CH_2CH_3$	L	1409.0
431-42		$-SCH_3$	D/L [1]	1328.8
440-03		$-SCH_3$	D	1319.1
440-78		$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	D/L [1]	1359.9 [2]
440-34-3			D	1416.2
440-36		$-CH_3$	D	1251.1

[1] các đồng phân không bị tách ra; [2] tín hiệu m^+.

Những sự cải biến bổ sung các nhóm chức tại phần AA1 (hoặc AA3, tương ứng) có thể được thực hiện để thu được các hợp chất dẫn xuất khác nhau, như là các este, amit, rượu, v.v. Các hợp chất bão hòa có thể thu được bằng cách giảm liên kết đôi được tạo thành trong phản ứng Wittig.

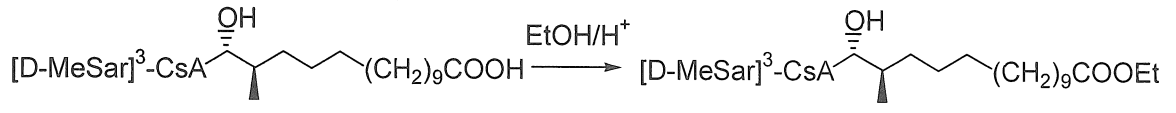
Ví dụ 22: Sự tạo thành amit từ axit Cacboxylic– Tổng hợp hợp chất 440-08



440-02 **440-08**

Hợp chất 440-02 (48mg, 0,037mmol) được hòa tan trong môi trường nitơ trong 5mL DCM khan và được làm lạnh đến 0°C. Đixyclohexylcacbođiimit (DCC, 11,6mg, 0,056mmol) và 1-hyđroxybenzotriazol (HOBt, 5,0mg, 0,037mmol) được thêm vào và hỗn hợp được khuấy trong 15 phút ở 0°C. Đimetylamin (dung dịch 2M trong THF, 0,19mL, 0,38mmol) được thêm vào và tiếp tục khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Phản ứng được pha loãng bằng 20mL DCM và được rửa với 15mL HCl 0,5 M. Pha hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 và sau đó được làm khô. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

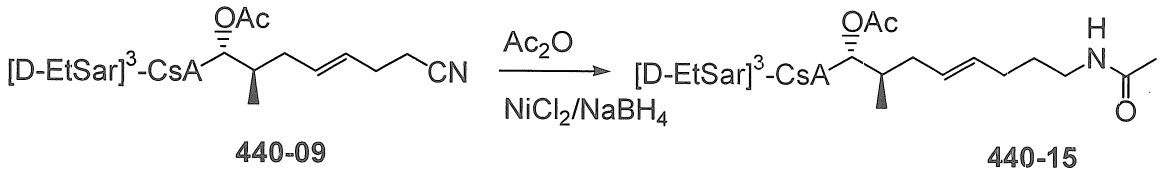
Ví dụ 23: Sự tạo thành este – Tổng hợp hợp chất 440-31



440-20 **440-31**

Hợp chất 440-20 (30mg, 0,022mmol) được hòa tan trong 4mL EtOH khan và 2µL H_2SO_4 đặc. Phản ứng được gia nhiệt đến điều kiện hồi lưu trong 3 giờ và sau đó được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Phản ứng được đem làm khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

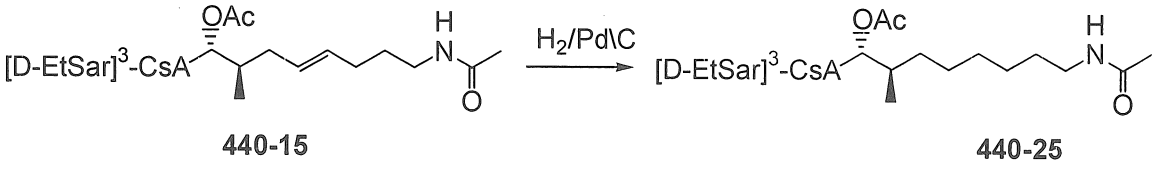
Ví dụ 24: Sự tạo thành amit từ hợp chất nitril (Amit nghịch đảo) – Tổng hợp hợp chất 440-15



440-09 **440-15**

Bình thót cổ 50mL được nạp hợp chất 440-09 (80mg, 0,061mmol) và 5mL MeOH trong môi trường nitơ. Phản ứng được làm lạnh đến 0°C và $Ni(II)Cl_2 \cdot 6H_2O$ (1,4mg, 0,006mmol) và anhyđrit axetic (19µL, 0,20mmol) được thêm vào. Natri bohyđrua (104mg, 2,75mmol) được bổ sung theo 2 mẻ trong 2 giờ. Sau đó phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ phòng và được khuấy qua đêm. Sau khi phản ứng hoàn thành, 7mL HCl 1M được thêm vào. Dung dịch được cô đặc trong chân không đến thể tích xấp xỉ một nửa thể tích ban đầu của nó. Hỗn hợp thu được được chiết bằng EtOAc, phần chiết được rửa với dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và nước muối và được làm khô trên Na_2SO_4. Dung môi được loại bỏ trong chân không. Sản phẩm, chứa một số hợp chất bão hòa, được sử dụng trong bước tiếp theo mà khỏn cần tinh chế thêm nữa.

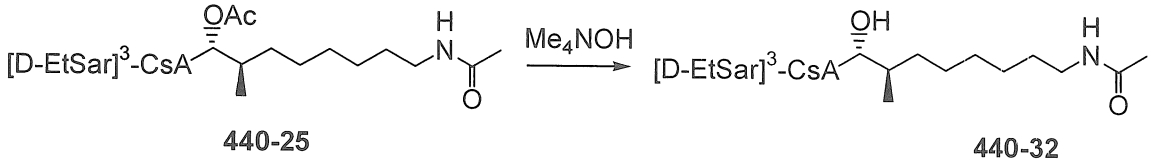
Ví dụ 25: Tổng hợp hợp chất 440-25



440-15 **440-25**

Hợp chất 440-15 (83mg, 0,061mmol) được hòa tan trong 10mL EtOH khan. Paladi (10% trọng lượng trên Cacbon, 8mg) và 3-4 giọt axit axetic được thêm vào. Phản ứng được hyđro hóa dưới áp suất không khí ở nhiệt độ phòng trong vài ngày cho đến khi phản ứng hoàn toàn bởi HPLC. Phản ứng được lọc qua Celite và nước lọc được làm bay hơi đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế và sau đó được đưa vào bước loại axetyl.

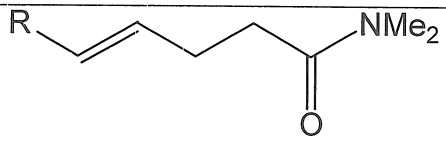
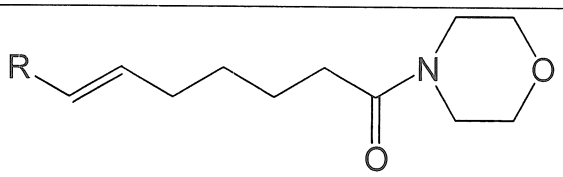
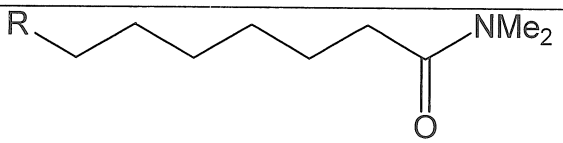
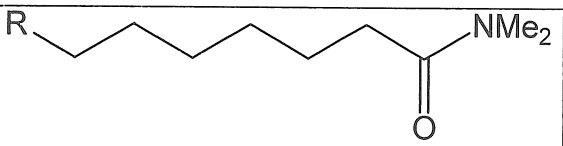
Ví dụ 26: Tổng hợp hợp chất 440-32

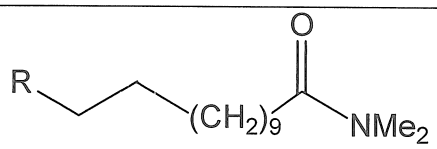
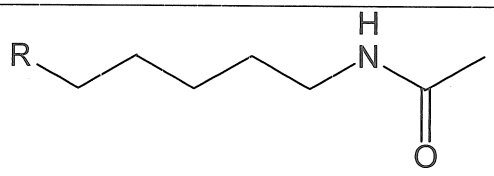
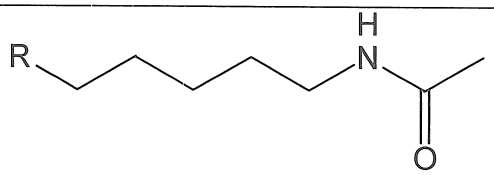
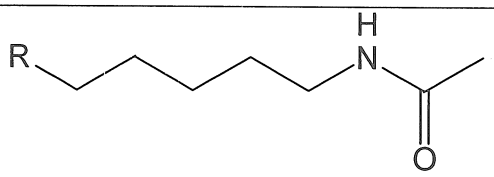
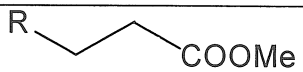
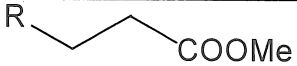
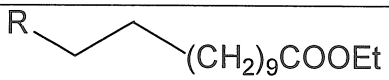


440-25 **440-32**

Hợp chất 440-25 (41mg, 0,03mmol) được hòa tan trong 4mL MeOH và tetrametylamoni hyđroxit pentahyđrat (16mg, 0,09mmol, được hòa tan trong 1mL H_2O) được thêm vào. Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Phản ứng được cô đặc trong chân không. Bổ sung 5mL H_2O vào và phản ứng được chiết bằng EtOAc. Phần chiết được rửa với nước muối, được làm khô trên Na_2SO_4 và được bay hơi đến khô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế.

Bảng 4: Ví dụ về các dẫn xuất của các hợp chất Xyclosporin được cải biến 1,3 thu được bằng cách giảm liên kết đôi được tạo thành trong phản ứng Wittig (X và Y theo Fig. 3; và sự tham chiếu R trong X để chỉ ra sự gắn cấu trúc AA1 của CsA).

Hợp chất	X	R23	Đồng phân	MS (Na^+)
431-23		$-CH_3$	L	1323,8
431-29		$-CH_3$	L	1393,9
440-08		$-CH_3$	D	1354,1
440-27		$-CH_2CH_3$	D	1368,1

440-23		$-CH_3$	D	1424,2
431-32		$-CH_3$	D	1325,9
431-53		- CH_2CH_3	L	1339,9
440-32		- CH_2CH_3	D	1340,1
440-10-2		$-CH_3$	D	1285,0
440-22-2		- CH_2CH_3	D	1299,1
440-31		$-CH_3$	D	1425,2

Thí nghiệm ức chế isomeraza của Xyclophilin A

Một thí nghiệm về enzym được sử dụng để đo sự ức chế độ hoạt động CyP-A bởi các chất tương tự 1,3 CsA của sáng chế, theo quy trình thí nghiệm được mô tả trong tài liệu chuyên ngành khoa học với những thay đổi nhỏ. Thí nghiệm dựa trên khả năng của CyP-A xúc tác sự thay đổi cấu hình trong các peptit chứa prolin từ cấu hình đồng phân *cis* đến *trans*. Nói ngắn gọn, chất nền peptit bao gồm nửa phân tử nitroanilit được đưa vào hỗn hợp phản ứng chứa CyP-A, hợp chất thử nghiệm (chất tương tự CsA, CsA, hoặc dung môi đimetylsulfoxit), và enzym thứ hai, alpha-chymotrypsin. Mỗi hợp chất thí nghiệm được thử nghiệm ở 10 nồng độ trong ba lần hoặc bốn lần. Peptit được chuyển hóa từ cấu hình *cis* sang cấu hình *trans* bằng cả hai quy trình không xúc tác và có xúc tác CyP. Đồng phân *trans* của peptit, nhưng không bao gồm đồng phân *cis*, là một chất nền cho alpha-chymotrypsin. Alpha-chymotrypsin ngay lập tức được tách nitroanilit ra khỏi phần còn lại của peptit, và nitroanilit tự do được tích

lũy với tốc độ tỉ lệ với sự đồng phân hóa *cis-trans*. Vì nitroalinit tự do là một sản phẩm có màu, sự tích lũy của nó được định lượng bằng cách đo sự hấp thụ của nó bằng một quang phổ kế. Sự tích lũy nitroalinit được đo trong 6 phút, và hằng số tốc độ bậc một đối với mỗi phản ứng được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism. Hằng số tốc độ xúc tác CyP-A của mỗi phản ứng được xác định bằng cách trừ hằng số tốc độ không xúc tác (được suy ra từ phản ứng không có CyP-A) ra khỏi hằng số tốc độ của toàn bộ phản ứng. Các sơ đồ về hằng số tốc độ xúc tác dưới dạng một hàm của các nồng độ chất ức chế đã chỉ ra hiệu lực của các hợp chất, được xác định bằng các giá trị IC_{50} của nó.

Quy trình thí nghiệm chi tiết

A. Peptit

Peptit được thí nghiệm là N-sucxinyl-alanin-alanin-prolin-phenylalanin-p-nitroalinit. Nó được hòa tan tới nồng độ 3mM trong dung dịch chứa trifloetanolamin và lithi clorua (TFE/LiCl). TFE/LiCl được chuẩn bị mới mỗi ngày bằng cách hòa tan lithi clorua trong trifloetanolamin tới nồng độ 17mg/ml. Sự hòa tan tiếp theo của LiCl, hàm lượng nước của dung dịch TFE/LiCl được giảm bằng cách thêm các rây phân tử được sấy khô bằng nhiệt và trộn nhẹ dung dịch trong ít nhất 30 phút. Sau đó, peptit được hòa tan trong TFE/LiCl, và dung dịch được làm lạnh đến 4°C – 8°C trước khi thí nhiệm. Sự hòa tan peptit trong TFE/LiCl khô đã thúc đẩy nhiều peptit tồn tại ở cấu hình *cis* khi bắt đầu mỗi phản ứng thí nghiệm. Sự phân tích dữ liệu đã chỉ ra rằng có xấp xỉ 60% peptit trong các thí nghiệm này bắt đầu ở dạng đồng phân *cis*, phù hợp với dữ liệu được báo cáo trong tài liệu chuyên ngành khoa học. Trong các phản ứng enzym, peptit được pha loãng liên tiếp 20 lần đến nồng độ thí nghiệm cuối cùng bằng 150μM.

B. Các hợp chất thử nghiệm

Các hợp chất thử nghiệm gồm có CsA, các chất tương tự CsA, hoặc đimetylsulfoxit (DMSO). Các dung dịch dự trữ của CsA và các chất tương tự CsA được chế tạo bằng cách pha loãng trong DMSO đến nồng độ10mg/ml trong các ống ly

tâm cỡ nhỏ vô trùng. Các dung dịch dự trữ được bảo quản ở -20°C khi không sử dụng. Sự pha loãng tiếp các hợp chất thử nghiệm được thực hiện vào mỗi ngày làm thí nghiệm. DMSO và CsA được thử nghiệm trong mỗi thí nghiệm để dùng làm dung môi đối chứng và hợp chất tham khảo, tương ứng.

Các dung dịch dự trữ 10mg/ml của CsA và các chất tương tự CsA được pha loãng bằng DMSO đến 50µM trong các ống ly tâm cỡ nhỏ, dựa trên trọng lượng phân tử của các hợp chất. Chín sự pha loãng liên tiếp 3 lần của mỗi hợp chất trong DMSO sau đó được thực hiện trong một tấm polystyren gồm 96 ống thử nghiệm nhỏ. Một phần phân ước của dung dịch DMSO hoặc một mình dung môi DMSO được pha loãng 50 lần trong dung dịch đệm của phản ứng (xem cách pha chế dưới đây) để tạo ra các nồng độ cuối cùng của CsA hoặc các chất tương tự CSA bằng 1000, 333, 111, 37, 12, 4,1, 1,4, 0,46, 0,15, và 0,05nM. Các dung dịch đệm của phản ứng được bảo quản ở 4°C – 8°C trong ít nhất một giờ trước khi thí nghiệm.

C. Dung dịch đệm của phản ứng

Dung dịch ban đầu (dung dịch đệm muối) đối với dung dịch đệm của phản ứng gồm có Hepes 50mM, natri clorua 100mM, và albumin huyết thanh ở người 1mg/ml, được điều chỉnh đến pH 8,0 bằng natri hyđroxit. Dung dịch đệm muối được bảo quản ở 4°C khi không sử dụng. Vào mỗi ngày thí nghiệm, alpha-chymotrypsin ở bò được hòa tan trong một thể tích dung dịch đệm muối đến nồng độ 1mg/ml. Một phần phân ước của dung dịch alpha-chymotrypsin được loại bỏ để dùng làm dung dịch đệm cho phản ứng đối chứng không xúc tác. Dạng tái tổ hợp ở người CyP-A được thêm vào phần còn lại của dung dịch chymotrypsin đến nồng độ 5nM. Dung dịch chứa alpha-chymotrypsin và CyP-A được chỉ định là dung dịch đệm phản ứng và được sử dụng để điều chế các dung dịch phản ứng.

D. Cách thức tiến hành phản ứng

Tất cả các phản ứng thí nghiệm được tiến hành trong một phòng lạnh trong khoảng nhiệt độ từ 4°C – 8°C. Tất cả các dung dịch và thiết bị được bảo quản trong phòng lạnh trong ít nhất 1 giờ trước khi làm thí nghiệm. Nhiệt độ thấp là cần thiết cho các phản ứng được tiến hành với tốc độ đủ chậm để đo được bằng thiết bị sẵn có. Thiết

bị đo lường là một máy đọc khay vi thể BMG Polarstar được tạo cấu hình để đọc độ hấp thụ ở mật độ quang (OD=optical density) 405nm. Các phản ứng được thực hiện trong các tấm thí nghiệm bằng polystyren, có đáy phẳng, gồm 96 ống thử nghiệm nhỏ. Mỗi lần chạy thí nghiệm gồm có 12 phản ứng riêng biệt trong một hàng của tấm. Peptit được chia phần phân ước thành 5µl mỗi ống thử nghiệm bằng pipet một kênh trong một hàng của tấm, sau đó tấm được đặt trong một giá đỡ dạng tấm của máy đọc khay vi thể. Các phản ứng được bắt đầu bằng cách phân phối 95µl dung dịch đệm của phản ứng vào mỗi ống thử nghiệm chứa peptit sử dụng pipet 12 kênh và trộn mỗi phản ứng một cách hoàn hảo bằng cách lặp lại việc lấy lên pipet để đảm bảo peptit được hòa tan đồng đều. 12 phản ứng trong mỗi lần chạy thí nghiệm được trình bày dưới đây:

a) 10 phản ứng, đại diện một lần lặp lại cho mỗi một trong 10 nồng độ của hợp chất thử nghiệm (CyP-A trong dung dịch đệm của phản ứng)
b) 1 phản ứng với 5µl dung môi DMSO (CyP-A trong dung dịch đệm của phản ứng)
c) 1 phản ứng với 5µl dung môi DMSO (CyP-A A vắng mặt dung dịch đệm của phản ứng)

Việc ghi sự hấp thụ được bắt đầu ngay lập tức sau khi trộn. Khoảng 15 giây trôi qua từ lúc thêm dung dịch đệm của phản ứng đến sự ghi nhận OD_{405} đầu tiên do thời gian trộn và cài đặt thiết bị. Các lần ghi tiếp theo được thực hiện tại các khoảng thời gian 6 giây đối với 60 lần ghi trong 360 giây. Ba hoặc bốn lần chạy phản ứng được thực hiện đối với mỗi hợp chất thử nghiệm để cung cấp các số liệu lặp lại.

E. Sự phân tích dữ liệu

Dữ liệu thô gồm có sự gia tăng OD_{405} phụ thuộc thời gian. Với sự có mặt của CyP-A và vắng mặt của chất ức chế, peptit được chuyển hóa hoàn toàn thành đồng phân *trans* trong khoảng 150 giây như được chứng minh bởi sự ổn định của OD_{405}. Dữ liệu OD_{405} so với thời gian được vẽ đồ thị bằng phần mềm Graphpad Prism và thích hợp với một phương trình pha mũ để suy ra hằng số tốc độ bậc một K cho mỗi phản ứng. Trong các phản ứng không có CyP-A, hằng số tốc độ hoàn toàn đại diện cho sự đồng phân hóa cis đến trans do nhiệt, tự phát không xúc tác của peptit và được định nghĩa là hằng số tốc độ không xúc tác K_0. Trong các phản ứng có chứa CyP-A, sự

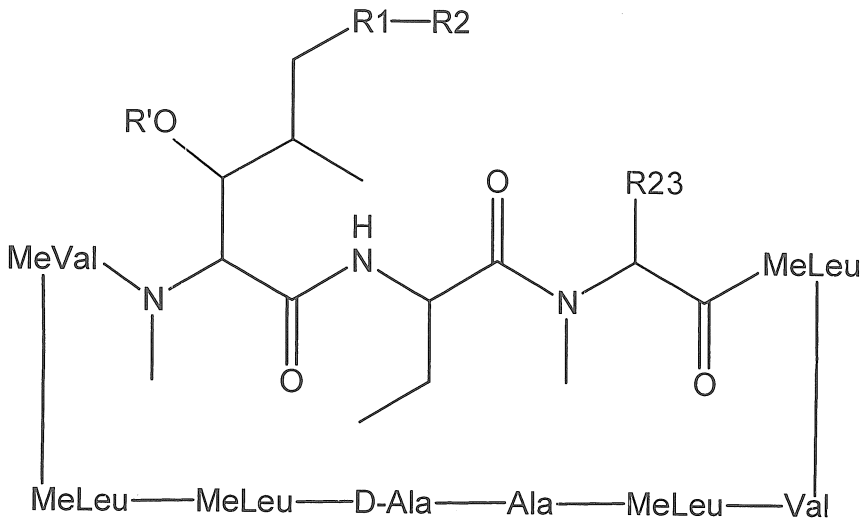
đồng phân hóa xảy ra bằng cả hai quá trình không xúc tác và có xúc tác enzym. Do đó, hằng số tốc độ K trong các phản ứng chứa CyP-A là tổng của hằng số tốc độ không xúc tác K_0 và hằng số tốc độ có xúc tác K_{cat}. K_{cat} được tính bằng cách trừ K_0 (thu được từ phản ứng không có CyP-A) ra khỏi hằng số tốc độ tổng cộng K. K_{cat} thường cao hơn 3 lần so với K_0 trong các phản ứng với 5nM CyP-A, 150μM chất nền peptit, và không có chất ức chế.

Các đồ thị của K_{cat} đối với nồng độ chất ức chế phù hợp với những hồi quy không tuyến tính liều lượng-phản ứng xichma để chứng minh hiệu lực của chất ức chế. Các giá trị EC_{50} được tính toán bằng phần mềm là những nồng độ của hợp chất thử nghiệm ức chế K_{cat} bằng 50%. Để tiêu chuẩn hóa sự biến đổi giữa các thí nghiệm trong các điều kiện thí nghiệm, CsA được hoạt động trong mỗi thí nghiệm như một chất tham khảo, và hiệu lực của các chất tương tự CsA được biểu diễn dưới dạng số lần hiệu lực so với CsA dựa trên các giá trị EC_{50}. Ví dụ, EC_{50} của chất tương tự CsA mà bằng ½ của CsA biểu thị hiệu lực cao 2 lần so với CsA, trong khi IC_{50} của chất tương tự CsA mà cao hơn 5 lần CsA biểu thị hiệu lực 0,2 lần so với CsA.

Bảng 5, được chỉ ra trong hình kèm theo, cho thấy sự ức chế xyclophilin A và sự ức chế miễn dịch của các chất tương tự CsA được cải biến tại vị trí 1 và tại vị trí 1 và 3 theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức L:

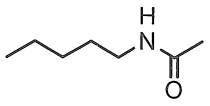


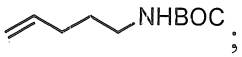
Công thức L

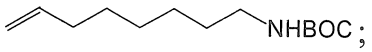
trong đó:

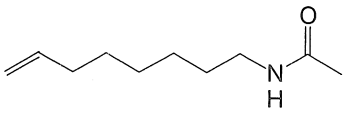
a. R' là H hoặc axetyl;

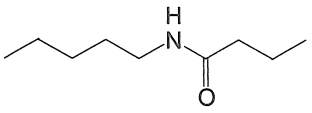
b. R1 - R2 được chọn từ nhóm gồm có:

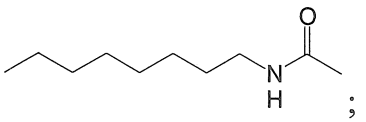
i.  ;

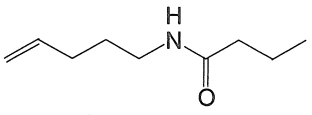
ii.  ;

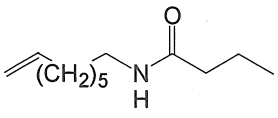
iii.  ;

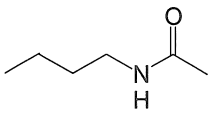
iv.  ;

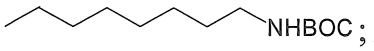
v.  ;

vi.  ;

vii.  ;

viii.  ;

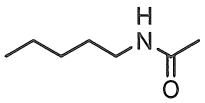
ix.  ; và

x.  ;

và

c. R23 là mạch cacbon béo được thế tùy ý, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, no hoặc không no.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R1 - R2 là

 .

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó R' là H.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó R23 được chọn từ nhóm gồm có:

i. $-CH_3$

ii. $-CH_2CH_3$

iii. $-CH_2CHCH_2$

iv. $-CH_2CH_2CH_2I$

v. $-(CH_2)_3CH_2I$

vi. $-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$

vii. $-CH_2CCH$

viii. $-CH_2CO_2(t\text{-}Bu)$

ix. $-CH_2Ph$

x. $-CH_2OH$

xi. $-CH(OH)CH_3$

xii. $-CH(OH)(t\text{-}Bu)$

xiii. $-CH(OH)Ph$

xiv. $-COOH$

xv. $-SCH_3$, và

xvi. $-S(p\text{-}Tol)$

5. Hợp chất theo điểm 4, trong đó R23 là $-CH_3$ hoặc $-CH_2CH_3$.

6. Hợp chất theo điểm 4, trong đó R23 là $-CH_3$.

7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó R23:

(a) bao gồm C1-C3 alkyl được thế tùy ý;

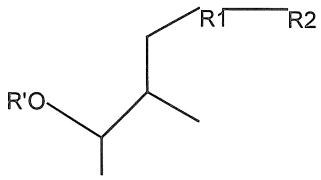
(b) được thế với một nhóm amin;

(c) là C1-C3-Ala và hợp chất này chứa D-epime;

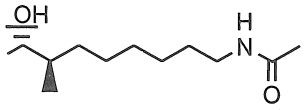
(d) là MeAla; và/hoặc

(e) là mạch cacbon béo, thẳng hoặc nhánh, chứa từ 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3 hoặc 2 nguyên tử cacbon.

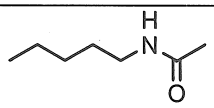
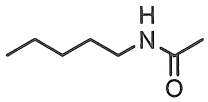
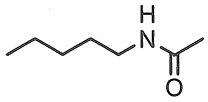
8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó:



trong công thức L là:



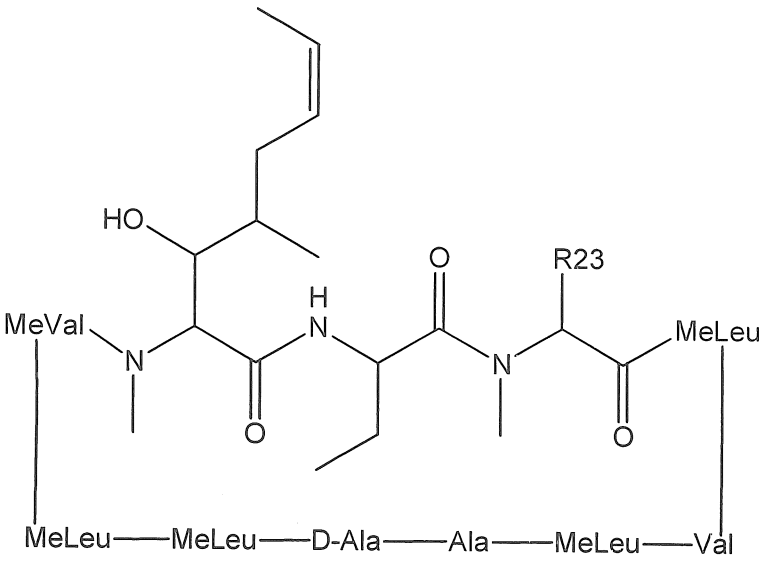
9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó R', R1 - R2 và R23 và đồng phân của chúng được chọn như sau:

R'	R1 – R2	R23	Đồng phân
H		$-CH_3$	D
H		$-CH_2CH_3$	L
H		$-CH_2CH_3$	D

10. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và một hoặc nhiều tá dược dược dụng.

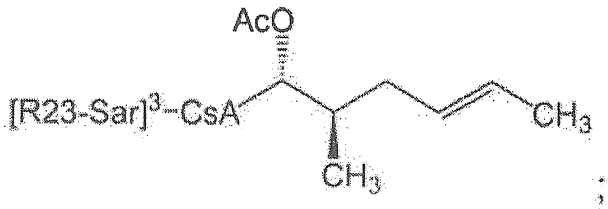
11. Quy trình điều chế hợp chất có công thức L như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, bao gồm các bước:

1) cho xyclosporin-A (CsA) phản ứng với lithi alkylamit có tính bazơ, với sự có mặt của một dung môi thích hợp, tiếp theo bằng phản ứng với một chất ái điện tử thích hợp để tạo ra hợp chất có công thức 1:



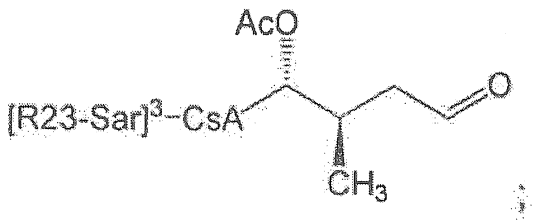
Công thức 1

2) cho hợp chất có công thức 1 phản ứng với AC_2O với sự có mặt của một dung môi thích hợp để tạo thành hợp chất có công thức 2A:



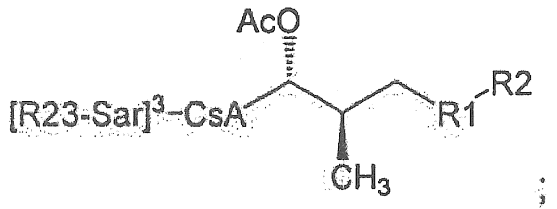
Công thức 2A

3) cho hợp chất có công thức 2A phản ứng với một chất oxy hóa để tạo thành hợp chất có công thức 3A:



Công thức 3A

4) cho phản ứng hợp chất có công thức 3A với một chất ái điện tử để tạo thành hợp chất có công thức 4A:



Công thức 4A

5) khử axyl tùy ý hợp chất có công thức 4A.

12. Quy trình theo điểm 11, trong đó việc điều chế công thức L nói trên bao gồm bước thêm một lượng dư LiCl vào dung môi thích hợp nói trên trong bước 1) để tạo thành chủ yếu L-epime của hợp chất có công thức L, hoặc việc điều chế công thức L nói trên được thực hiện không có mặt của LiCl để tạo thành chủ yếu D-epime của hợp chất có công thức L.

13. Quy trình theo một trong số các điểm từ 11 đến 12, trong đó lithi alkylamit có tính bazơ nói trên là lithi điispropylamit.

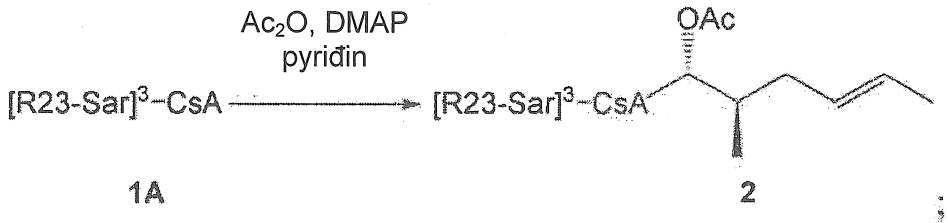
14. Quy trình theo một trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó chất ái điện tử nói trên được chọn từ nhóm được xác định trong bảng sau, để tạo thành R23 tương ứng được trình bày trong bảng này:

Chất ái điện tử	R23
metyl iođua	$-CH_3$
etyl iođua	$-CH_2CH_3$
allyl bromua	$-CH_2CHCH_2$
1,3-điiođopropan	$-CH_2CH_2CH_2I$

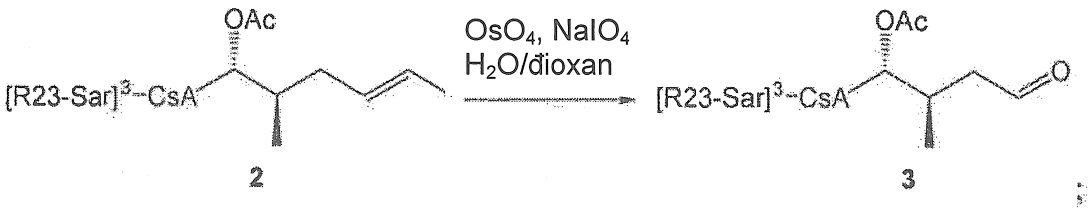
1,4-điiođobutan	$-(CH_2)_3CH_2I$
trimetylamoni-3-iođopropan hexaflophosphat	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$
propargyl bromua	$-CH_2CCH$
tert-butyl bromoaxetat	$-CH_2CO_2(t\text{-}Bu)$
benzyl bromua	$-CH_2Ph$ [2]
formalđehyt	$-CH_2OH$
axetalđehyt	$-CH(OH)CH_3$
pivalalđehyt	$-CH(OH)(t\text{-}Bu)$ [3]
benzalđehyt	$-CH(OH)Ph$
cacbon đioxit	$-COOH$
đimetyl đisulfit	$-SCH_3$
p-tolyl đisulfit	$-S(p\text{-}Tol)$

15. Quy trình điều chế hợp chất có công thức L như được xác định theo điểm 1 bao gồm các bước:

1) cho hợp chất có công thức 1A phản ứng với đimetylaminopriđin với sự có mặt của dung môi thích hợp, để tạo thành hợp chất có công thức 2:



tiếp theo tùy ý bởi sự tạo thành alđehyt có công thức 3:



tiếp theo tùy ý bởi phản ứng Wittig để tạo ra các hợp chất có công thức L, trong đó R23 được chọn từ nhóm gồm có:

i. $-CH_3$;

ii. $-CH_2CH_3$;

iii. $-CH_2CHCH_2$;

iv. $-CH_2CH_2CH_2I$;

v. $-(CH_2)_3CH_2I$;

vi. $-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$;

vii. $-CH_2CCH$;

viii. $-CH_2CO_2$(t-Bu);

ix. $-CH_2Ph$[2];

x. $-CH_2OH$;

xi. $-CH(OH)CH_3$;

xii. $-CH(OH)$(t-Bu)[3];

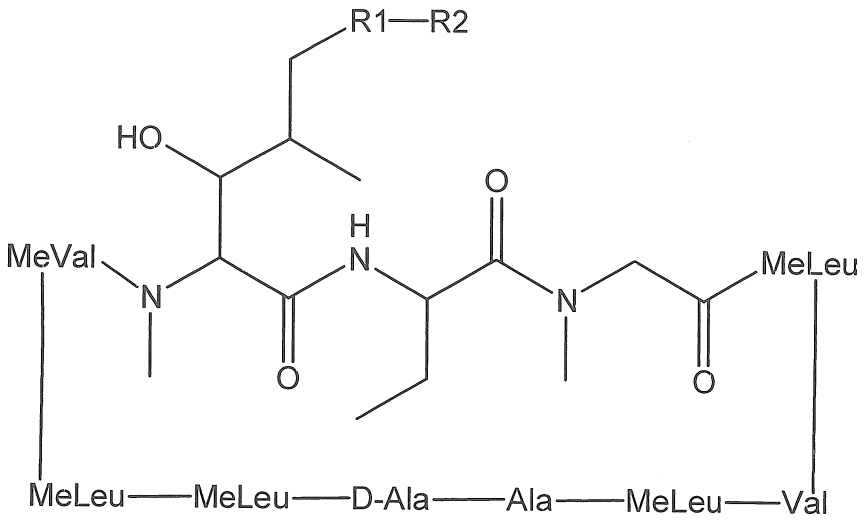
xiii. $-CH(OH)Ph$;

xiv. $-COOH$;

xv. $-SCH_3$; và

xvi. $-S$(p-Tol).

16. Quy trình điều chế hợp chất có công thức L như được xác định theo điểm 1, bao gồm các bước: cho hợp chất có công thức 5, trong đó R1-R2 như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-9, phản ứng với lithi alkylamit có tính bazơ, với sự có mặt của một chất ái điện tử thích hợp trong một dung môi thích hợp để tạo thành hợp chất có công thức L, trong đó R23 bao gồm C1-C3 alkyl được thế tùy ý.

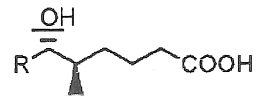
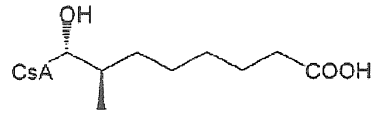
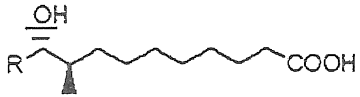
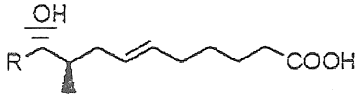
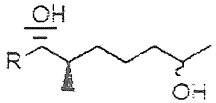


Công thức 5

17. Quy trình theo điểm 16, trong đó lithi alkylamit có tính bazơ nói trên là lithi điispropylamit.

Fig. 1A

Bảng 5

	Sự cải biến	Cấu trúc đã cải biến-1		1 + 3-D-MeAla	
Tên h/c cải biến -1	Cấu trúc đã cải biến-1	Sự ức chế CyP A Số lần hiệu lực so với CsA	% ức chế miễn dịch so với CsA	Sự ức chế CyP A Số lần hiệu lực so với CsA	% ức chế miễn dịch so với CsA
404-58		0,16	< 1	1,3	< 1
420-171		2,3		8,7	< 1
420-19		3,7	< 1	9,5	3,4
416-08		3,7	< 1	14,3	3
404-98		2,2	6,5	15	7,6

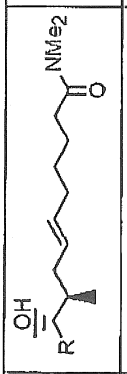
404-154		0.98	2	8.3 bão hòa	9.2 bão hòa
420-30-1		3,3	< 1	11,7	< 1
420-103		0,19	10	1,9 bão hòa	7,7 bão hòa
404-173		1,14	2,6	3,9	4
404-76		0,65	12,5	2,8	9,7
404-194		0,61	2	4,4	1,4

Fig. 1B

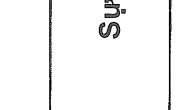
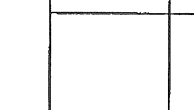
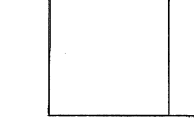
Sự cải biến		Cấu trúc đã cải biến-1		1 + 3-D-EtSar	
Tên h/c cải biến -1	Cấu trúc đã cải biến-1	Sự ức chế CyP A Số lần hiệu lực so với CsA	% ức chế miễn dịch so với CsA	Sự ức chế CyP A Số lần hiệu lực so với CsA	% ức chế miễn dịch so với CsA
404-58		0,16	< 1	0,56	< 1
420-19		3,7	< 1	4,2	2,3
404-154		0,98	2	10,6 bão hòa	4,1 bão hòa
420-30-1		3,3	< 1	8,9	1,1
404-194		0,61	2	2,1	4,9

Fig. 1C