



(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)



1-0027941

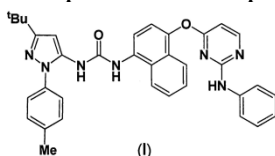
(51)⁷ C07D 403/12; C07D 491/10; A61K
31/4155; A61K 31/506

(13) B

- (21) 1-2014-01074 (22) 03/10/2012
(86) PCT/GB2012/052445 03/10/2012 (87) WO 2013/050757 A1 11/04/2013
(30) 11183682.1 03/10/2011 EP; 11183688.8 03/10/2011 EP; 12168395.7 16/05/2012 EP;
12168396.5 16/05/2012 EP
(45) 25/04/2021 397 (43) 25/07/2014 316A
(73) RESPIVERT LIMITED (GB)
50-100 Holmers Farm Way, High Wycombe, Buckinghamshire, HP12 4EG, GB
(72) ITO, Kazuhiro (JP); CHARRON, Catherine Elisabeth (CA); KING-UNDERWOOD,
John (GB); ONIONS, Stuart Thomas (GB); LONGSHAW, Alistair Ian (GB);
BROECKX, Rudy (BE); FILLIERS, Walter (BE); COPMANS, Alex (BE).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) HỢP CHẤT 1-PYRAZOLYL-3-(4-((2-ANILINOPYRIMIDIN-4-
YL)OXY)NAPHTALEN-1-YL)URE LÀM CHẤT ỨC CHẾ PROTEIN KINAZA
ĐƯỢC HOẠT HÓA BỞI TÁC NHÂN PHÂN BÀO P38, DƯỢC PHẨM VÀ SẢN
 PHẨM KẾT HỢP CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) là chất ức chế của họ protein kinaza enzym được hoạt hóa tác nhân gây phân bào p38. Hợp chất theo sáng chế được sử dụng trong điều trị, bao gồm các dược phẩm kết hợp, đặc biệt trong điều trị các bệnh viêm nhiễm, bao gồm các bệnh viêm phổi, như hen và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến dược phẩm và sản phẩm kết hợp chứa hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất là các chất ức chế thuộc họ enzym protein kinaza được hoạt hóa bởi tác nhân phân bào p38 (được đề cập ở đây là chất ức chế kinaza MAP p38), ví dụ, các nhóm phụ anfa và gamma kinaza của chúng, và Syk kinaza và họ Src thuộc họ tirozin kinaza. Hợp chất theo sáng chế được sử dụng trong điều trị, bao gồm dược phẩm, đặc biệt trong điều trị các chứng viêm, cụ thể là bệnh viêm phổi, như bệnh hen và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD), cũng như đối với các bệnh về đường tiêu hóa, như viêm loét đại tràng và bệnh Crohn và các bệnh về mắt, chẳng hạn như viêm màng bồ đào. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và sản phẩm kết hợp bao gồm hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bốn chất đồng dạng p38 MAPK (anfa, beta, gamma và delta tương ứng), được xác định mỗi trong số chúng biểu hiện mẫu mô ở người khác nhau. Các chất đồng dạng anfa và beta p38 MAPK được tìm thấy trên khắp cơ thể, có mặt ở nhiều loại tế bào khác nhau. Chất đồng dạng anfa cũng khác biệt trong vai trò của nó ở các chứng viêm. Mặc dù các nghiên cứu sử dụng phương pháp di truyền hóa học ở chuột cho thấy chất đồng dạng beta p38 MAPK không có vai trò trong các chứng viêm (O'Keefe, S.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(48):34663-71.); nó có thể liên quan đến cơ cấu đau do biểu hiện của COX2 (Fitzsimmons, B.L. *et al.*, *Neuroreport*, 2010, 21(4):313-7). Các chất đồng dạng này bị ức chế bởi một số hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ như đã được mô tả. Các lớp ban đầu của các chất ức chế có độc tính cao do sự phân chia mô rộng của các chất đồng dạng này dẫn đến việc có nhiều hiệu ứng sai mục đích của các hợp chất. Ngoài ra, sự sản sinh một lượng đáng kể các chất ức chế đã không được duy trì vì phạm vi đánh giá tính an toàn không phù hợp với các nghiên cứu lâm sàng (Pettus, L.H. và Wurz, R.P., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, 8(16):1452-67.). Theo các tác dụng phụ đã nêu sự đa dạng với chemotype, và các hợp chất có các mẫu chọn lọc kinaza khác biệt, các độc tính được quan sát có thể liên quan đến phần cấu trúc hơn là dựa trên cấu trúc p38.

Ít được biết đến với chất đồng dạng gamma và delta p38 MAPK, không giống như isozim anfa và beta được biểu hiện ở các mô và tế bào đặc hiệu. Chất đồng dạng delta P38 MAPK được biểu hiện nhiều hơn ở tuyến tụy, tinh hoàn, phổi, ruột non và thận. Nó cũng được thấy nhiều ở đại thực bào và có thể có mặt trong các bạch cầu trung tính, tế bào T CD4+ và ở các tế bào nội mô (Shmueli, O. *et al.*, *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10-11):1067-1072; Smith, S. J. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149:393-404; Hale, K. K., *J. Immunol.*, 1999, 162(7):4246-52; Wang, X. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(38):23668-23674.) Sự phân bố của gamma p38 MAPK là rất ít mặc dù nó được biểu hiện nhiều hơn ở não, cơ xương và tim, cũng như ở tế bào lympho và đại thực bào (Shmueli, O. *et al.*, *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10-11):1067-1072; Hale, K. K., *J. Immunol.*, 1999, 162(7):4246-52; Court, N. W. *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34(4):413-26; Mertens, S. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1996, 383(3):273-6.).

Các chất ức chế phân tử nhỏ chọn lọc của gamma p38 MAPK và delta p38 MAPK hiện không có sẵn, mặc dù một hợp chất được bộc lộ trước đó, BIRB 796, được biết là có hoạt tính ức chế liên đồng dạng. Sự ức chế của chất đồng dạng gamma và delta p38 MAPK được quan sát thấy ở nồng độ cao của hợp chất so với ức chế anfa p38 MAPK và beta p38 (Kuma, Y., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280:19472-19479.). Ngoài ra, BIRB 796 cũng làm suy yếu phosphoryl hóa của p38 MAPK hoặc JNK bởi kinaza MKK6 hoặc MKK4 ngược dòng. Kuma đã thảo luận về khả năng làm thay đổi bản chất riêng gây ra bởi sự liên kết của chất ức chế đối với protein MAPK có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của cả hai chất phosphoryl hóa và vị trí tiếp giáp với chất hoạt hóa ngược dòng, từ đó làm suy yếu phosphoryl hóa của p38 MAPK hoặc JNK.

P38 MAP kinaza được tin là có đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình phát tín hiệu có liên quan đến sự khởi đầu và duy trì chứng viêm mãn tính và dai dẳng ở bệnh của con người, ví dụ, ở bệnh hen nặng và COPD (Chung, F., *Chest*, 2011, 139(6):1470-1479.). Hiện tại có nhiều tài liệu chứng minh rằng p38 MAP kinaza được hoạt hóa bởi một loạt các cytokin tiền viêm và tác dụng hoạt hóa của nó trong quá trình thu nạp và giải phóng của các cytokin tiền viêm bổ sung. Thực sự, dữ liệu từ một số các nghiên cứu lâm sàng chứng minh sự thay đổi mang lại lợi ích

trong hoạt tính của bệnh ở những bệnh nhân trong quá trình điều trị với chất ức chế MAP p38 kinaza. Ví dụ, Smith đã mô tả tác dụng ức chế của các chất ức chế p38 MAP kinaza trên TNF α (không dựa trên IL-8) giải phóng từ PBMCs người.

Chất ức chế p38 MAP kinaza sử dụng trong điều trị bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD) cũng đã được đề xuất. Các chất ức chế phân tử nhỏ nhằm mục tiêu đến p38 MAPK α/β đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc giảm các thông số khác nhau của sự viêm ở các tế bào và trong các mô được lấy từ các bệnh nhân bị COPD, những người nói chung không nhạy cảm với corticosteroid, (Smith, S.J., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, **149**:393-404.) cũng như các mô hình động vật in vivo trong cơ thể (Underwood, D.C. *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 2000, **279**:L895-902; Nath, P. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, **544**:160-167.). Irusen và đồng nghiệp cũng đã cho thấy khả năng tham gia của p38 MAPK α/β với tính không nhạy cảm với corticosteroid qua việc giảm ái lực gắn kết của thụ thể glucocorticoid (GR) trong nhân (Irusen, E. *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 109:649-657.). Thử nghiệm lâm sàng với một loạt các chất ức chế kinaza MAP p38, bao gồm AMG548, BIRB 796, VX702, SCIO469 và SCIO323 đã được mô tả (Lee, M.R. và Dominguez, C., *Current Med. Chem.*, 2005, 12:2979-2994.).

COPD là tình trạng trong đó quá trình viêm được báo cáo là chống lại đáng kể đối với hoạt tính chống viêm của corticosteroid dạng hít. Do đó, chiến lược để điều trị COPD tốt hơn là làm tăng sự can thiệp trong đó đồng thời có tác dụng chống viêm bẩm sinh và khả năng tăng sự nhạy cảm của mô phổi của các bệnh nhân bị COPD đối với corticosteroid dạng hít. Một tài liệu gần đây của Mercado (Mercado, N., *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2011, 80(6):1128-1135.) chứng minh rằng p38 MAPK γ cảm có tiềm năng khôi phục sự nhạy cảm đối với corticosteroid. Do đó có thể có lợi ích kép cho các bệnh nhân khi sử dụng chất ức chế p38 MAP kinaza để điều trị COPD và bệnh hen nặng. Tuy nhiên, trở ngại lớn cản trở các lợi ích của các chất ức chế p38 MAP kinaza trong điều trị các bệnh viêm mạn tính ở người là độc tính nghiêm trọng quan sát thấy ở bệnh nhân dẫn tới việc rút khỏi sự phát triển lâm sàng của nhiều hợp chất bao gồm các chất đặc biệt đã được đề cập ở trên.

Nhiều bệnh nhân được chẩn đoán bị hen hoặc bị COPD lại tiếp tục xuất hiện triệu chứng không kiểm soát được và từ các triệu chứng trầm trọng của họ dẫn đến

việc phải nhập viện. Điều này xảy ra dù đã sử dụng các phác đồ điều trị tiên tiến nhất hiện có, bao gồm các sản phẩm kết hợp của corticosteroid dạng hít và chất chủ vận- β tác động lâu dài. Dữ liệu được tích lũy hơn thập kỷ qua cho thấy sự thất bại trong việc quản lý hiệu quả các thành phần viêm cơ bản của bệnh về phổi là lý do có thể làm cho bệnh trở nên trầm trọng. Kết quả thu được đã biết của corticosteroid đối với các chất chống viêm và, đặc biệt, với corticosteroid dạng hít trong điều trị bệnh hen, những phát hiện này kích thích sự điều tra cao. Kết quả nghiên cứu đã xác định được rằng một số chấn thương do môi trường dẫn đến những thay đổi ở chứng viêm không có tác dụng với corticosteroid ở phổi của bệnh nhân. Ví dụ về phản ứng phát sinh từ nhiễm trùng đường hô hấp trên do virus đi qua trung gian (URTI), do đó nó dẫn đến sự tăng tỷ lệ mắc hen và bệnh COPD.

Các cuộc điều tra dịch tễ học đã cho thấy mối liên quan giữa nhiễm virus đường hô hấp trên và một tỷ lệ đáng kể ở các đợt bệnh nhân đã được chẩn đoán với bệnh đường hô hấp mạn tính. Một số dữ liệu thuyết phục nhất trong vấn đề này xuất phát từ các nghiên cứu theo chiều dọc của trẻ em bị hen (Papadopoulos, N.G., Papi, A., Psarras, S. và Johnston, S.L., *Paediatr. Respir. Rev.*, 2004, 5(3):255-260.). Một loạt các nghiên cứu bổ sung hỗ trợ cho kết luận này rằng sự viêm nhiễm do virus có thể thúc đẩy và làm tăng sự trầm trọng của căn bệnh. Ví dụ, nhiễm trùng lâm sàng thử nghiệm với virus mũi đã được báo cáo là gây ra siêu phản ứng phế quản với histamin ở các bệnh nhân mắc bệnh hen không thích ứng với điều trị bằng corticosteroid (Grunberg, K., Sharon, R.F., *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164(10):1816-1822.). Thêm bằng chứng xuất phát từ việc kết hợp quan sát giữa các đợt bệnh trầm trọng ở các bệnh nhân bị xơ và nhiễm trùng nang HRV (Wat, D., Gelder, C., *et al.*, *J. Cyst. Fibros.*, 2008, 7:320-328.). Phù hợp với các dữ liệu này là phát hiện sự nhiễm virus đường hô hấp, bao gồm virus mũi, có mặt của yếu tố có tính độc lập tương quan âm tính với tỷ lệ sống 12 tháng ở trẻ em, bệnh nhân nhận ghép phổi (Liu, M., Worley, S., *et al.*, *Transpl. Infect. Dis.*, 2009, 11(4):304-312.).

Nghiên cứu lâm sàng cho thấy tải lượng virus tương ứng với triệu chứng và các biến chứng quan sát được và, có nghĩa là, với mức độ trầm trọng của tình trạng viêm. Ví dụ, sau khi bị nhiễm virus mũi thử nghiệm, các triệu chứng đường hô hấp dưới và tình trạng dễ phản ứng của phế quản tương quan đáng kể với cơ cấu nạp

virut (Message, S.D., Laza-Stanca, V., *et al.*, *PNAS*, 2008; 105(36):13562-13567.). Tương tự, với sự không có mặt của các tác nhân virut khác, việc nhiễm virut mũi thường có liên quan đến các bệnh nhiễm trùng đường hô hấp dưới và chứng thở khò khè, khi cơ cấu nạp virut cao ở các bệnh nhi có hệ miễn dịch (Gerna, G., Piralla, A., *et al.*, *J. Med. Virol.*, 2009, 81(8):1498-1507.).

Điều thú vị là, qua báo cáo gần đây việc tiếp xúc trước với virut mũi dẫn đến sự giảm phản ứng xytokin gây ra bởi các sản phẩm của vi khuẩn trong đại thực bào phế nang của người (Oliver, B.G., Lim, S., *et al.*, *Thorax*, 2008, 63:519-525.). Ngoài ra, sự nhiễm các tế bào biểu mô mũi với virut mũi đã được dẫn chứng bằng tư liệu để thúc đẩy sự bám dính của vi khuẩn, bao gồm *S. aureus* và *H. influenzae* (Wang, J.H., Kwon, H.J. và Yong, J.J., *The Laryngoscope*, 2009, 119(7):1406-1411.). Những tác dụng của tế bào này có thể góp phần vào tần suất bệnh nhân bị nhiễm trùng đường hô hấp dưới tăng sau khi bị nhiễm trùng ở đường hô hấp trên. Theo đó, việc trị liệu thích hợp được tập trung vào khả năng can thiệp mới để giảm tải lượng virut ở một loạt hệ thống trong ống nghiệm, như yếu tố dự báo về lợi ích của chúng theo thiết lập lâm sàng.

Các nhóm nguy cơ cao, dành cho các bệnh nhân bị nhiễm virut mũi ở đường hô hấp trên có thể dẫn đến các biến chứng thứ cấp nghiêm trọng, không chỉ giới hạn ở các bệnh nhân bị bệnh hô hấp mạn tính. Chúng bao gồm, ví dụ, sự miễn dịch kém với những bệnh nhân dễ bị nhiễm trùng đường hô hấp dưới, cũng như các bệnh nhân phải trải qua hóa trị liệu, những bệnh nhân phải đối mặt với bệnh cấp tính, bị sốt sẽ đe dọa đến tính mạng. cũng đã đề nghị rằng các bệnh mạn tính khác, chẳng hạn như bệnh tiểu đường, có liên quan đến phản ứng miễn dịch bị xâm nhập. Điều này làm tăng khả năng bị nhiễm trùng đường hô hấp và phải nhập viện (Peleg, A.Y., Weerarathna, T., *et al.*, *Tiểu đường Metab. Res. Rev.*, 2007, 23(1):3-13; Kornum, J.B., Reimar, W., *et al.*, *Tiểu đường Care*, 2008, 31(8):1541-1545.).

Trong khi đường hô hấp trên bị viêm do virut là nguyên nhân của bệnh và tử vong là đáng kể ở các bệnh nhân bị bệnh tiềm ẩn hoặc các yếu tố rủi ro khác; chúng cũng tạo gánh nặng đáng kể cho bệnh nhân khi chăm sóc sức khỏe nói chung và nó là nguyên nhân chính gây mất nhiều thời gian học tập và làm việc của họ (Rollinger, J.M. và Schmidtke, M., *Med. Res. Rev.*, 2010, Doi 10.1002/med.20176.). Những

nhận xét này làm cho rõ ràng hơn về loại thuốc mới, có sự cải thiện hơn về phương pháp điều trị hiện nay, nó đang được yêu cầu tiến hành khẩn trương để ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm đường hô hấp trên gián tiếp do virus mũi gây ra. Nói chung, các chiến lược được áp dụng để phát hiện ra các thuốc kháng virus được cải tiến nhằm mục đích sản xuất các protein khác nhau từ virus, để can thiệp điều trị bệnh. Tuy nhiên, một số lớn các tip huyết thanh virus mũi giúp cho việc theo đuổi sự tiếp cận vô cùng khó khăn và có thể giải thích tại sao, tại thời điểm hiện tại, thuốc để phòng ngừa và điều trị bệnh nhiễm virus mũi vẫn chưa được duyệt bởi bất kỳ cơ quan quản lý nào.

Virus xâm nhập vào các tế bào chủ có liên quan đến sự hoạt hóa của một số đường truyền tín hiệu nội bào mà chúng được tin là đóng một vai trò quan trọng trong sự khởi đầu của quá trình viêm (xem xét bởi Ludwig, S, 2007; *Signal Transduction*, 7:81-88.) và việc sản sinh virus và giải phóng chúng sau đó. Một trong những cơ chế này, đã được xác định có vai trò trong sự sản sinh virus cúm *in vitro*, là sự hoạt hóa của đường chuyển hóa phosphoinositid 3-kinaza / Akt. Đã được ghi nhận rằng đường chuyển hóa tín hiệu này được kích hoạt bởi Protein NS1 của virus (Shin, Y.K., Liu, Q. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2007, 88:13-18.) và sự ức chế của nó làm giảm độ chuẩn của virus thể hệ con (Ehrhardt, C., Marjuki, H. *et al.*, *Cell Microbiol.*, 2006, 8:1336-1348.).

Hơn nữa, các chất ức chế U0126 MEK đã được dẫn chứng bằng tư liệu để ức chế sự lây lan virus mà không tạo ra tình trạng khẩn cấp của biến thể kháng virus (Ludwig, S., Wolff, T. *et al.*, *FEBS Lett.*, 2004, 561(1-3):37-43.). Gần đây, các nghiên cứu về sự ức chế kinaza Syk đích đã chứng minh rằng enzym đóng một vai trò quan trọng trong việc làm trung gian virus mũi thâm nhập vào các tế bào và cũng phản ứng với chứng viêm giảm virus, bao gồm sự điều chỉnh ICAM-1 (Sanderson, M.P., Lau, C.W. *et al.*, *Inflamm. Allergy thuốc Targets*, 2009, 8:87-95.). Hoạt tính Syk được báo cáo rằng đã được kiểm soát bởi c-Src kinaza dòng ngược nhiễm HRV (Lau, C. *et al.*, *J. Immunol.*, 2008, 180(2):870-880.). Một số ít nghiên cứu đã thấy xuất hiện liên kết hoạt tính các tế bào Src (Src1 hoặc p60-Src) hoặc Kinaza thuộc họ Src bị nhiễm virus. Chúng thể hiện rằng adenovirus kích thích tạo ra hoạt tính trung gian kinaza PI3 của Akt thông qua cơ chế phụ thuộc c-Sr. Được gợi ý rằng virus mũi

39 kích thích sản xuất IL-8 trong các tế bào biểu mô phụ thuộc vào hoạt tính kinaza Src (Bentley, J.K., Newcomb, D.C., *J. Virol.*, 2007, 81:1186-1194.). Cuối cùng, đã được đề xuất rằng hoạt tính của kinaza Src có liên quan đến cảm ứng của việc sản xuất mucin bằng virus mũi 14 trong các tế bào biểu mô và các tuyến phụ niêm mạc (Inoue, D. và Yamaya, M., *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2006, 154(3):484-499.).

Đã được công bố rằng các hợp chất ức chế hoạt động của kinaza c-Src và Syk là các thuốc hữu hiệu ngăn sự nhân rộng của virus mũi (Charron, C.E. *et al.*, WO 2011/158042.) và các hợp chất ức chế p59-HCK có hiệu quả ngăn chặn sự nhân rộng virus cúm (Charron, C.E. *et al.*, WO 2011/070369.). Với những lý do được tóm tắt ở trên, các hợp chất được sử dụng để điều trị các bệnh hô hấp mạn tính kết hợp những đặc tính vốn có với ức chế MAPKs p38, dự kiến là đặc biệt hiệu quả.

Một số các chất ức chế MAPK p38 cũng đã được mô tả như các chất ức chế của sự nhân rộng virus hỗn bào hô hấp (Cass, L. *et al.*, WO 2011/158039.).

Hơn nữa, cần lưu ý rằng chất ức chế MAPK p38 đã được phát hiện đem lại lợi ích cho các bệnh nhân bị IBD sau một tuần điều trị mà không theo đuổi đợt điều trị bao gồm bốn tuần (Schreiber, S. *et al.*, *Clin. Gastro. Hepatology*, 2006, 4:325-334.).

Ngoài vai trò quan trọng trong khả năng tín hiệu tế bào kiểm soát các hoạt động của đường chuyển hóa tiền viêm, enzym kinaza bây giờ cũng được công nhận trong điều chỉnh hoạt động của một loạt các chức năng tế bào. Một trong số những việc đã được thảo luận gần đây là việc duy trì tính toàn vẹn DNA (Shilo, Y. *Nature Reviews ung thư*, 2003, 3:155-168.) và sự phối hợp của các quá trình phức hợp của phân chia tế bào. Một minh họa cho những phát hiện gần đây là công bố mô tả tác động của tập hợp các chất ức chế tác động theo cái gọi là "kinaza Olaharsky" vào tần suất của sự hình thành vi nhân trong ống nghiệm (Olaharsky, A.J. *et al.*, *PLoS Comput. Biol.*, 2009, 5(7):e1000446.). Sự hình thành vi nhân liên quan đến, hoặc được kết hợp với, sự gián đoạn của quá trình phân bào và do đó là một biểu hiện không mong muốn của độc tính tiềm năng. Ức chế của kinaza trực khuẩn đại tràng glycogen 3 α (GSK3 α) đã được thấy là một yếu tố đặc biệt quan trọng làm tăng khả năng hình thành vi nhân thúc đẩy chất ức chế kinaza. Gần đây, ức chế kinaza GSK3 β với RNAi cũng đã được ghi nhận trong thúc đẩy sự hình thành vi nhân (Tighe, A. *et al.*, *BMC Cell Biology*, 2007, 8:34.).

Có thể giảm những tác động bất lợi phát sinh từ sự tương tác của thuốc với kinaza Olaharsky, như GSK3 α , bằng việc tối ưu hóa liều thuốc và/hoặc bằng cách thay đổi thời gian sử dụng. Tuy nhiên, sẽ thuận lợi hơn để xác định các phân tử hữu dụng trong điều trị mà bộc lộ hoạt tính thấp hoặc các hoạt tính ngăn các enzym sai mục đích này và do đó thúc đẩy một ít hoặc không tạo sự gián đoạn của quá trình phân bào, được xem xét trong xét nghiệm phân bào.

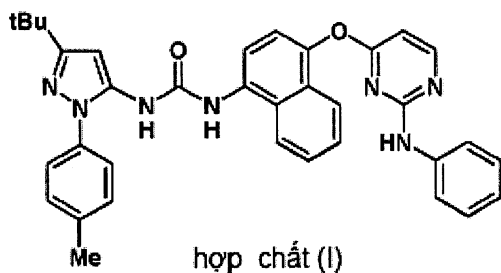
Rõ ràng khi xem xét các tài liệu được trích dẫn trên đây vẫn thấy còn cần phải xác định và phát triển chất ức chế kinase MAP p38 mới đã được cải thiện khả năng chữa trị hơn các phương pháp điều trị hiện nay. Các hợp chất mong muốn là những hợp chất thể hiện chỉ số điều trị cao bằng cách sử dụng, ít nhất, ảnh hưởng không kém đến hiệu quả như các thuốc trước đây, nhưng theo một hoặc nhiều khía cạnh, sẽ ít độc hại ở liều điều trị thích hợp. Mục tiêu của sáng chế là cung cấp hợp chất mới nêu trên mà ức chế hoạt động của enzym ở kinaza p38 MAP, ví dụ với tính riêng biệt kiểu phụ, cùng với kinaza SYK và kinaza tyrosin thuộc họ Src (đặc biệt là c-Src) do có được đặc tính kháng viêm tốt, và phù hợp để sử dụng trong điều trị.

Hợp chất (I) thể hiện thời gian tác dụng dài hơn và/hoặc tác dụng tồn tại so với trước đó bộc lộ chất ức chế BIRB 796 kinaza p38 MAP allosteric (Pargellis, C. *et al.*, *Nature Struct. Biol.*, 2002, 9(4):268-272.). Một phương án phụ đề cập hợp chất mới này ở một hoặc nhiều thể rắn, thể tinh thể mafcos về sự ổn định thể chất và hóa chất cao thích hợp cho việc tạo ra dạng thuốc hít.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả của sáng chế đã tiến hành nghiên cứu chuyên sâu với mục đích là giải quyết các vấn đề như nêu trên của các tài liệu tình trạng kỹ thuật. Cụ thể là, sáng chế đề xuất các hợp chất mới mà là các chất ức chế thuộc họ enzym protein kinaza được hoạt hóa bởi tác nhân phân bào p38 (được đề cập ở đây là chất ức chế kinaza MAP p38), được sử dụng trong điều trị, bao gồm dược phẩm, đặc biệt trong điều trị các chứng viêm, cụ thể là bệnh viêm phổi, như bệnh hen và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD), cũng như đối với các bệnh về đường tiêu hóa, như viêm loét đại tràng và bệnh Crohn và các bệnh về mắt, chẳng hạn như viêm màng bồ đào.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I):



hoặc muối được dụng hoặc hòa tan của chúng, bao gồm các chất đồng phân lập thể và chất hỗn biến của chúng.

“Hợp chất có công thức (I)” cũng có thể được gọi ở đây là “Hợp chất (I)”.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất đến Hợp chất (I) như được định nghĩa ở trên là bazơ tự do.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất đề cập đến Hợp chất (I) như được định nghĩa ở trên là bazơ tự do khan.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất đến Hợp chất (I) như được định nghĩa ở trên là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất đến Hợp chất (I) như được định nghĩa ở trên là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn A.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất đến Hợp chất (I) như được định nghĩa ở trên là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X (XRPD) thu được từ mẫu Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn A.

Fig.2 thể hiện mẫu XRPD thu được từ mẫu Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B, sau micro hóa.

Fig.3 bộc lộ kết quả phân tích nhiệt trọng lượng của mẫu Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B, sau micro hóa.

Fig. 4 mô tả sơ đồ đẳng nhiệt hấp thụ hơi bằng lực động (DVS) thu được từ các mẫu Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B sau micro hóa.

Fig. 5 mô tả kết quả thử nghiệm trễ được tiến hành trên Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng B đa hình, tinh thể, rắn, sau micro hóa, để xác định mức độ và tốc độ hấp thụ độ ẩm/giải hấp với thời gian ngắn những thay đổi ở độ ẩm tương đối.

Fig.6 là phổ hồng ngoại (IR) thu được từ mẫu Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B sau micro hóa.

Fig.7 thể hiện phân tích nhiệt của mẫu Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B (được micro hóa) bởi phép phân tích nhiệt quét vi sai (DSC).

Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất có công thức (I) được bộc lộ ở đây là: 1-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-(phenylamino)pyrimidin-4-yloxy)naphtalen-1-yl)ure. Các mẫu muối của hợp chất (I) chứa các muối được dụng, ví dụ như, không giới hạn, muối cộng axit của axit khoáng mạnh chẳng hạn như muối HCl và HBr và muối cộng của axit hữu cơ mạnh chẳng hạn như axit methanesulfonic.

Như các định nghĩa được sử dụng dưới đây về hợp chất có công thức (I) được dự tính bao gồm muối, solvat hóa, và các chất hỗ biến của hỗn hợp đã nêu, trừ trường hợp chỉ định đặc biệt khác. Các ví dụ về solva hóa bao gồm hydrat.

Ở đây sáng chế cũng đề cập đến phát triển tiền dược chất của hợp chất có công thức (I), điều đó nói rằng các hợp chất phá vỡ và/hoặc được chuyển hóa trong cơ thể để cung cấp hợp chất hoạt tính có công thức (I). Các ví dụ tổng quát về tiền dược chất bao gồm este thông thường, và các este khác như hỗn hợp este cacbonat, cacbammat, glycozit, ete, axetal và ketal.

Sáng chế bao gồm tất cả các dẫn xuất chất mang đồng vị của hợp chất (I). Vì vậy, sáng chế bao gồm các hợp chất là các hợp chất của hợp chất (I) có một hoặc nhiều nguyên tử đã được thay thế bởi nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối khác với khối lượng nguyên tử hoặc số khối thường được thấy trong tự nhiên, hoặc trong đó tỷ lệ nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối ít được thấy trong tự nhiên đã được tăng lên (các khái niệm sau này được gọi là “giàu chất mang đồng vị”). Vì vậy, các hợp chất bộc lộ bao gồm các hợp chất mà nguyên tử được quy định là chất đồng vị xuất hiện tự nhiên hoặc không tự nhiên. Theo một phương án, chất đồng vị là chất đồng vị ổn định. Vì vậy, các hợp chất của bản mô tả bao gồm, ví

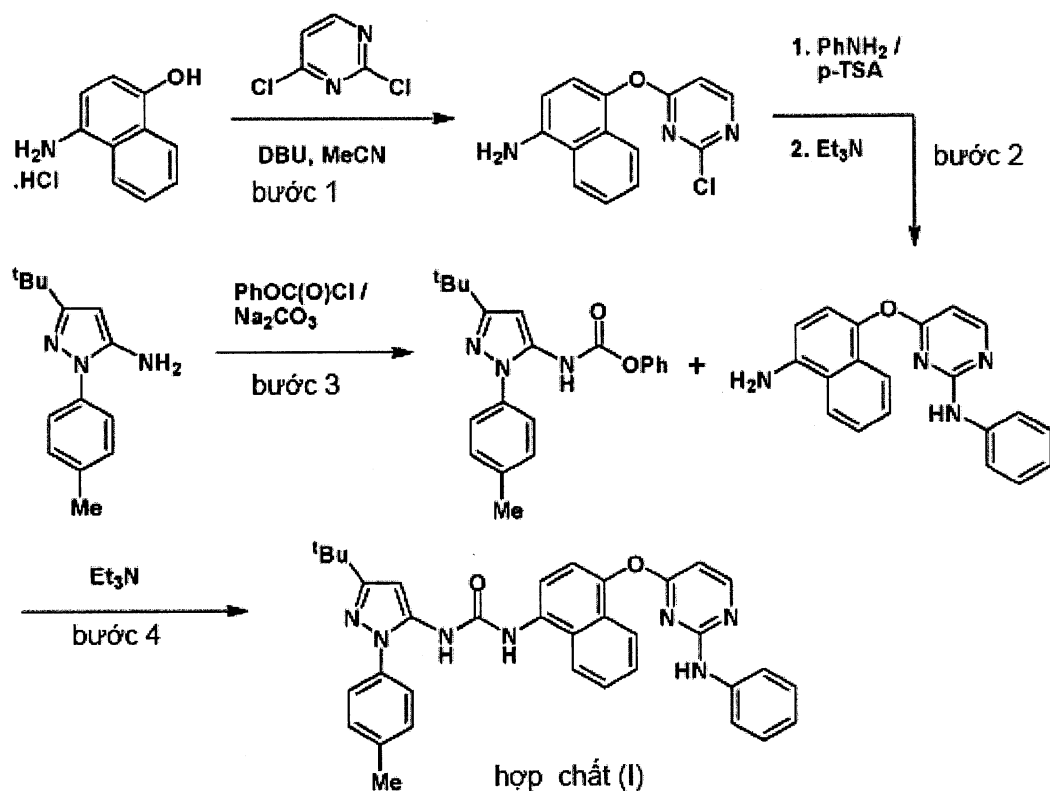
dự đoteri bao gồm các hợp chất và các chất tương tự. Vì vậy, theo một phương án của sáng chế, hợp chất (I) chứa mức độ làm giàu của đoteri ở một hoặc nhiều nguyên tử hydro (ví dụ đối với mức nước nguyên tử đã cho của chất đồng vị đoteri vượt quá các số 20%, 50%, 75%, 90%, 95% hoặc 99%). Các ví dụ về các chất đồng vị khác mà có thể được đưa vào hợp chất (I) hoặc được làm giàu trong hợp chất (I) bao gồm các chất đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, khí oxy, flo, iot và clo chẳng hạn như ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{123}I hoặc ^{125}I , mà có thể các chất đồng vị xuất hiện tự nhiên hoặc không tự nhiên.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, nó đề cập đến một hoặc nhiều các chất chuyển hóa của hợp chất có công thức (I), cụ thể chất chuyển hóa mà giữ một hoặc nhiều hoạt tính trị liệu của hợp chất có công thức (I). Chất chuyển hóa, như được đề cập ở đây, là hợp chất mà được điều chế trong cơ thể từ sự chuyển hóa của hợp chất có công thức (I), ví dụ như, không chỉ giới hạn ở, các chất chuyển hóa oxy và/hoặc các chất chuyển hóa phát sinh, ví dụ, từ O-dealkylation.

Bản mô tả cũng mở rộng tới tất cả dạng đa hình của các hợp chất được định nghĩa ở đây.

Quy trình phù hợp để điều chế hợp chất có công thức (I) được cho thấy dưới đây (Sơ đồ 1).

Sơ đồ 1



Các nhóm bảo vệ có thể được cần để bảo vệ các nhóm cảm ứng hóa học trong một hoặc nhiều các phản ứng được mô tả ở trên, để đảm bảo rằng quá trình có thể được thực hiện và/hoặc là hiệu quả. Vì vậy, nếu mong muốn hoặc cần thiết, các hợp chất trung gian có thể được bảo vệ bằng việc sử dụng các nhóm bảo vệ thường biết trong lĩnh vực này. Các nhóm bảo vệ và phương thức để loại bỏ chúng được mô tả trong “Các nhóm bảo vệ trong tổng hợp hữu cơ”, của Theodora W. Greene và Peter G. M. Wuts, được xuất bản bởi John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540.

Điều chế chi tiết của Hợp chất (I) được bộc lộ ở Ví dụ 1.

Các chất trung gian mới như được mô tả ở đây bộc lộ một khía cạnh của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể, rắn. Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A có thể thu được, ví dụ, bằng kết tinh Hợp chất (I) từ axetat isopropyl. Theo khía cạnh cụ thể của sáng chế đề cập đến Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, có thể thu

được, ví dụ, bằng kết tinh Hợp chất (I) từ axeton và nước. Tỷ lệ đặc thù của axeton với nước là phù hợp cho quá trình này nằm trong khoảng 5:1 và 200:1 ví dụ nằm trong khoảng 10:1. Nói cách khác, dạng B có thể thu được bằng sự kết tinh Hợp chất (I) chỉ từ axeton. Sự điều chế cụ thể của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn A và B được bộc lộ ở Ví dụ 1 và 3 của Phần thực nghiệm, tương ứng.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, ở trạng thái rắn của Hợp chất (I) có thể được cải thiện bằng cách tiếp tục bước tạo huyền phù hoặc tái tinh thể hóa để điều chế, ví dụ, vật liệu có hình thái học được cải thiện và/hoặc chứa mức độ khử của dung môi dư. Ví dụ, dung môi dư có thể được loại ra khỏi Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B bằng cách tạo huyền phù Hợp chất (I) ở dạng đa hình B, trong nước, hoặc như được lựa chọn bằng cách tiếp tục tái tinh thể hóa từ axeton. Mô tả chi tiết của quy trình tạo huyền phù phù hợp được bộc lộ ở Ví dụ 3a của Phần thực nghiệm.

Theo một phương án đề cập đến dạng đa hình kết tinh, rắn A của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan có mẫu XRPD về cơ bản như được thấy ở Fig.1. Phương pháp thu được dữ liệu XRPD được mô tả ở phần Các phương pháp phân tích (Analytical Methods) và dữ liệu được trình bày ở Ví dụ 5.

Vì vậy, nó đề cập đến Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A có mẫu XRPD với ít nhất một (Ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm hoặc mười sáu) có các đỉnh ở 7,8, 8,7, 10,3, 11,2, 12,4, 15,2, 16,2, 17,5, 19,7, 20,8, 22,6, 23,1, 24,6, 25,5, 26,7, 27,4 ($\pm 0,2$ độ, chỉ số 2-teta), các đỉnh này khác biệt ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A. Các đỉnh 10,3, 15,2, 17,5, 23,1, 24,6, 26,7 và 27,4 là đặc biệt khác biệt đối với dạng đa hình, tinh thể, rắn A và do vậy tốt hơn là ít nhất một (Ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc bảy) của các đỉnh này có thể quan sát được ở mẫu XRPD.

Theo một phương án khác đề cập đến dạng đa hình, tinh thể, rắn B của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan (được micro hóa) có mẫu XRPD cơ bản như được thấy ở Fig.2. Phương pháp micro hóa được mô tả ở Ví dụ 4 và phương pháp thu được dữ liệu XRPD được mô tả ở Các phương pháp phân tích (Analytical Methods) và dữ liệu được trình bày ở Ví dụ 5.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B (được micro hóa) có mẫu XRPD với ít nhất một (Ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, mười sáu, mười bảy hoặc mười tám) các đỉnh 3,9, 6,1, 7,7, 8,6, 10,9, 11,8, 12,7, 14,3, 15,9, 16,7, 18,3, 18,7, 19,9, 20,9, 22,0, 22,6, 25,2, 28,9 ($\pm 0,2$ độ, giá trị 2-teta), các đỉnh này khác biệt ở dạng đa hình tinh thể rắn B. Các đỉnh 3,9, 6,1, 11,8, 14,3, 16,7, 18,3, 18,7 và 28,9 là đặc biệt khác biệt đối với dạng đa hình, tinh thể, rắn B và do vậy tốt hơn là có ít nhất một (Ví dụ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám) của các đỉnh này có thể quan sát được ở mẫu XRPD.

Các điểm chảy của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A và B được xác định có sử dụng phép phân tích nhiệt quét vi sai như được mô tả ở Ví dụ 6. Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A được phát hiện có điểm chảy là 191.6°C, và Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B được phát hiện có điểm chảy là 214°C. dạng đa hình B cũng được phát hiện có nhiệt dung hợp cao hơn ở dạng đa hình A. Như đã giải thích ở Ví dụ 6, các kết quả này đề xuất rằng dạng đa hình B ổn định nhiệt động nhiều hơn dạng đa hình A.

Độ ổn định vật lý và hóa học của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, được nghiên cứu, kết quả của chúng được bộc lộ dưới đây.

Để đánh giá tính ổn định vật lý, Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B được micro hóa theo quy trình được mô tả ở Ví dụ 4, và các mẫu của vật liệu thu được được bảo quản ở các bình chứa mở và chịu nhiệt độ môi trường khác nhau và độ ẩm tương đối. Các đặc tính và sự ổn định vật lý của các mẫu được nghiên cứu có sử dụng phổ học TGA, DSC, DVS, IR và sự phân tích XRPD. Các quy trình thí nghiệm đầy đủ được bộc lộ ở Phần quy trình tổng hợp và kết quả được tóm tắt ở Ví dụ 7 (Bảng 8). Như được trình bày ở Ví dụ 7, Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B (được micro hóa) được phát hiện có sự ổn định vật lý tốt. Các quy trình thí nghiệm tương tự cũng được thực hiện có sử dụng Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B ở dạng không được micro hóa và kết quả được thấy là cơ bản tương tự với micro hóa vật liệu thu được,

ví dụ, Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B ở cả dạng micro hóa và dạng không micro hóa được phát hiện có sự ổn định vật lý tốt.

Để đánh giá tính ổn định hóa học, Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B được micro hóa theo quy trình được mô tả ở Ví dụ 4. Được micro hóa các mẫu được bảo quản ở các bình chứa mở và chịu nhiệt độ môi trường khác nhau và độ ẩm tương đối. Tính ổn định hóa học của các mẫu được phân tích bằng HPLC. Kết quả được tóm tắt ở Ví dụ 8 (Bảng 9) nơi được bộc lộ rằng Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, micro hóa chính được thấy là có tính ổn định hóa học, mặc dù một số được nhận thấy là có tính nhạy với ánh sáng.

Như kết quả của các nghiên cứu tình trạng chất rắn được bộc lộ ở đây, đã kết luận rằng Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B có thể được micro hóa và rằng vật liệu thu được có tính ổn định về vật lý và hóa học.

Hợp chất có công thức (I) là chất ức chế kinaza MAP p38 (đặc biệt là kiểu phụ anpha) và ở một khía cạnh của Hợp chất là hữu dụng trong điều trị các bệnh viêm nhiễm, ví dụ COPD và/hoặc hen.

Ngạc nhiên là Hợp chất bộc lộ thời gian có tác dụng và/hoặc tác dụng tồn tại lâu hơn so với chất ức chế kinaza MAP p38 BIRB796 được bộc lộ trước đây.

Sự duy trì của tác dụng như được sử dụng ở đây có liên quan đến tốc độ phân rã hoặc tính ổn định sự phân rã của Hợp chất mục tiêu (ví dụ như thụ thể). Tốc độ phân rã thấp có thể dẫn đến tính duy trì.

Tốc độ phân rã thấp khi hòa tan với tỉ lệ kết hợp cao có xu hướng đề cập đến các thực thể điều trị hiệu nghiệm.

Hợp chất có công thức (I) được mong đợi là có công hiệu trong cơ thể.

Thông thường, các hợp chất về lĩnh vực kỹ thuật này được phát triển cho đến nay được sử dụng cho uống. Chiến lược này có liên quan đến các hợp chất tối ưu mà đạt được thời gian có tác dụng của chúng bằng tính được động học thích hợp. Vì vậy, đảm bảo rằng nồng độ thuốc đủ cao được thiết lập và duy trì giữa các liều để cung cấp lợi ích lâm sàng. Kết quả tất yếu của phương pháp này là tất cả các mô của cơ thể, và đặc biệt gan và ruột, được tiếp xúc với nồng độ hữu hiệu của phương pháp

siêu trị liệu của thuốc, liệu chúng có hoặc không có ảnh hưởng tốt đến bệnh đang được điều trị.

Chiến lược khác là đưa ra mô hình điều trị trong đó thuốc được định lượng trực tiếp đối với bộ phận bị viêm (điều trị tại chỗ). Trong khi phương pháp này không thích hợp để điều trị tất cả các bệnh viêm mạn tính, nó đã được tiến hành với các bệnh phổi (hen, COPD), các bệnh về da (viêm da dị ứng và bệnh vẩy nến), các bệnh về mũi (viêm mũi dị ứng) và rối loạn tiêu hóa (viêm loét đại tràng).

Trong cách điều trị tại chỗ, hiệu quả có thể đạt được bằng cách đảm bảo thuốc này có thời gian tác dụng lâu dài và thuốc được giữ lại ở bộ phận có liên quan để giảm thiểu nguy cơ bị nhiễm độc toàn thân hoặc bằng cách đưa ra công thức tạo ra “nguồn” với hoạt tính thuốc. Từ đó có thể xác định được tính hiệu quả mong muốn của chúng. Phương pháp đầu tiên được minh họa bằng thuốc tiotropium chống tiết cholin (Spiriva). Hợp chất này được dùng tại chỗ với phổi trong điều trị COPD, và có mối quan hệ đặc biệt cao đối với thụ thể đích của chúng, kết quả là với tỷ lệ và thời gian duy trì tác dụng hiệu quả rất chậm.

Theo một khía cạnh của sự mô tả hợp chất có công thức (I) đặc biệt thích hợp đối với phân tán tại chỗ, chẳng hạn như sự phân tán đến phổi, đặc biệt trong điều trị bệnh về đường hô hấp, ví dụ các bệnh hô hấp mạn tính chẳng hạn như COPD và/hoặc hen.

Theo một phương án hợp chất có công thức (I) phù hợp với các bệnh nhân nhạy cảm với điều trị bằng corticosteroid vì sẽ kháng lại với phác đồ điều trị này.

Hợp chất có công thức (I) cũng có thể là hữu dụng để điều trị viêm khớp dạng thấp.

Hợp chất có công thức (I) có thể có các đặc tính kháng virus, ví dụ như khả năng ngăn ngừa sự nhiễm của các tế bào (ví dụ như các tế bào biểu mô đường hô hấp) với picornavirus, cụ thể là virus mũi, cúm hoặc virus hợp bào hô hấp.

Vì vậy, các hợp chất được cho là một loại thuốc kháng virus, cụ thể phù hợp cho sự phòng bệnh, điều trị hoặc cải thiện các bệnh nhiễm picornavirus, chẳng hạn như bệnh nhiễm virus mũi, cúm hoặc virus hợp bào hô hấp.

Theo một phương án hợp chất có công thức (I) có thể làm giảm chứng viêm được gây ra bởi nhiễm virus, chẳng hạn như bị nhiễm virus mũi và cụ thể bị nhiễm virus dẫn đến việc giải phóng các xytokin như IL-8, đặc biệt là đối với cơ thể. Hoạt động này có thể, ví dụ, được thử nghiệm trong ống nghiệm sử dụng virus mũi tạo ra thử nghiệm IL-8 như được mô tả ở Ví dụ dưới đây.

Theo một phương án hợp chất có công thức (I) có thể làm giảm biểu hiện của ICAM1 được gây ra bởi virus mũi, đặc biệt trong cơ thể. ICAM1 là cơ chế thụ thể được sử dụng bởi cái gọi là tip huyết thanh virus mũi rãnh lớn để gây nhiễm khuẩn các tế bào. Hoạt động này có thể được đánh giá, ví dụ bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ dưới đây.

Được cho rằng các đặc tính nêu trên làm cho hợp chất có công thức (I) đặc biệt thích hợp cho việc sử dụng trong điều trị và/hoặc sự phòng bệnh viêm trở nên trầm trọng, cụ thể sự nghiêm trọng của virus, ở các bệnh nhân với một hoặc nhiều các bệnh mạn tính sau đây chẳng hạn như chứng suy tim sung huyết, COPD, hen, bệnh tiểu đường, bệnh ung thư và/hoặc ở các bệnh nhân suy giảm miễn dịch, ví dụ việc ghép sau ghép tạng.

Đặc biệt, các hợp chất có công thức (I) có thể là hữu dụng trong điều trị một hoặc nhiều các rối loạn hô hấp bao gồm COPD (bao gồm viêm phế quản mạn tính và khí phế thũng), hen, hen ở trẻ em, xơ nang, bệnh sáo, xơ hóa phổi tự phát, viêm mũi dị ứng, viêm mũi, viêm xoang, đặc biệt là hen, và COPD (bao gồm viêm phế quản mạn tính và khí phế thũng).

Hợp chất có công thức (I) cũng có thể là hữu dụng trong việc điều trị của một hoặc nhiều bệnh mà có thể được điều trị cục bộ hoặc khu trú bao gồm viêm kết mạc dị ứng, viêm kết mạc, viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc, bệnh vẩy nến, viêm loét đại tràng, viêm khớp dạng thấp thứ phát hoặc viêm xương khớp.

Cũng dự kiến rằng hợp chất có công thức (I) có thể là hữu dụng trong việc điều trị các bệnh khác như bệnh viêm khớp dạng thấp, viêm tụy, bệnh suy kiệt, sự ức chế sự phát triển và sự di căn của khối u bao gồm ung thư biểu mô tế bào phổi không nhỏ, ung thư vú, ung thư dạ dày, ung thư đại trực tràng và khối u ác tính.

Hợp chất có công thức (I) có thể là hữu dụng trong điều trị các bệnh hoặc sự rối loạn về mắt bao gồm viêm kết mạc dị ứng, viêm kết mạc, bệnh võng mạc tiểu đường, phù hoàng điểm (bao gồm phù hoàng điểm ướt và phù hoàng điểm khô), viêm sau phẫu thuật đục thủy tinh thể hoặc, đặc biệt, viêm màng bồ đào (bao gồm viêm màng bồ đào phía trước, phía sau và viêm nội nhãn).

Hợp chất có công thức (I) có thể là hữu dụng trong điều trị các bệnh về đường tiêu hóa hoặc sự rối loạn bao gồm viêm loét đại tràng hoặc bệnh Crohn.

Hợp chất có công thức (I) cũng có thể tái nhạy với tình trạng của bệnh nhân để điều trị với corticosteroid, khi tình trạng của bệnh nhân có khả năng kháng lại với triệu chứng tương tự.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất theo bản mô tả tùy chọn kết hợp với một hoặc nhiều chất pha loãng có thể chấp nhận được hoặc các chất mang.

Sáng chế cũng đề cập đến quá trình để điều chế dược phẩm này bao gồm việc trộn các thành phần.

Chất pha loãng và các chất mang có thể bao gồm các thuốc phù hợp dùng để tiêm, để uống, để bôi, dùng cho niêm mạc và trực tràng.

Như đã đề cập ở trên, các chế phẩm này có thể được bào chế ví dụ dùng để tiêm, tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, tiêm trong khớp hoặc quanh khớp, đặc biệt ở dạng dung dịch lỏng hoặc huyền phù; dùng để uống, đặc biệt ở dạng viên nén hoặc viên nang; ví dụ, dùng cho phổi khu trú hoặc dùng qua đường mũi, đặc biệt ở dạng bột, nhỏ mũi hoặc dạng xịt và dạng thẩm thấu qua da; ví dụ, dùng cho niêm mạc qua đường miệng, dùng để ngâm dưới lưỡi hoặc trong niêm mạc âm đạo, và dùng cho trực tràng ví dụ, ở dạng viên thuốc đạn.

Các chế phẩm có thể phù hợp để dùng ở dạng bào chế đơn vị và có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ được biết đến trong lĩnh vực dược phẩm, ví dụ như được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Các công thức dùng để có thể chứa tá dược nước vô trùng hoặc nước muối, glycol alkylen chẳng hạn như glycol propylen, glycol polyalkylen chẳng hạn như glycol polyetylen, dầu có nguồn gốc thực vật,

naptalin hydro hóa và tương tự. Các công thức dùng cho mũi có thể là thể rắn và có thể chứa tá dược, ví dụ, lactoza hoặc destran, hoặc có thể là dung dịch nước hoặc dầu để sử dụng ở dạng thuốc nhỏ mũi hoặc thuốc phun được định lượng. Đối với tá dược thông thường dùng cho miệng bao gồm đường, stearat canxi, stearat magiê, tinh bột tiền gelatin, và tương tự.

Các chế phẩm thích hợp dùng để uống có thể bao gồm một hoặc nhiều các chất mang và/hoặc tá dược tương hợp sinh lý và có thể ở dạng rắn hoặc lỏng. Viên nén và viên nang có thể được bào chế có chất kết dính, ví dụ, xirô, keo, gelatin, sorbitol, tragacan, hoặc poly-vinylpyrrolidon; chất độn, chẳng hạn như lactoza, lactoza, tinh bột ngô, phosphat canxi, sorbitol, hoặc glycin; chất làm trơn, chẳng hạn như stearat magiê, talc, glycol polyeylen, hoặc silic oxit; và chất hoạt động bề mặt, chẳng hạn như sulfat lauryl natri. Các chế phẩm lỏng có thể chứa các chất phụ gia thông thường, chẳng hạn như chất tạo hỗn dịch, ví dụ xirô sorbitol, metyl xenluloza, xirô đường, gelatin, xenluloza cacboxymetyl, hoặc mỡ ăn; các chất nhũ hóa chẳng hạn như lexitin, hoặc keo; dầu thực vật chẳng hạn như dầu quả hạnh, dầu dừa, dầu gan cá tuyết, hoặc dầu lạc; các chất bảo quản chẳng hạn như hydroxylanisol được bytyl hóa (BHA) và hydroxytoluen được butyl hóa (BHT). Các chế phẩm lỏng có thể được bao gói trong, ví dụ, gelatin để cung cấp dạng bào chế đơn vị.

Liều lượng thuốc uống dạng rắn bao gồm viên nén, viên nang vỏ cứng hai mảnh và viên nang gelatin có tính đàn hồi (SEG).

Thành phần vỏ khô thông thường bao gồm trong khoảng từ 40% đến 60% nồng độ gelatin, nằm trong khoảng từ 20% đến 30% nồng độ chất dẻo hóa (ví dụ như glycerin, sorbitol hoặc glycol propylen) và nằm trong khoảng từ 30% đến 40% nồng độ nước. Các vật liệu khác chẳng hạn như chất bảo quản, thuốc nhuộm, chất cản quang và hương vị cũng có thể có mặt. Vật liệu chứa đầy chất lỏng bao gồm thuốc dạng rắn đã được phân rã, hòa tan hoặc khuếch tán (với chất tạo hỗn dịch chẳng hạn như sáp ong, dầu thầu dầu hydro hóa hoặc glycol polyeylen 4000) hoặc thuốc dạng lỏng môi trường truyền hoặc kết hợp các chất dẫn chẳng hạn như dầu khoáng, dầu thực vật, triglycerit, glycol, polyol và các chất hoạt hóa bề mặt.

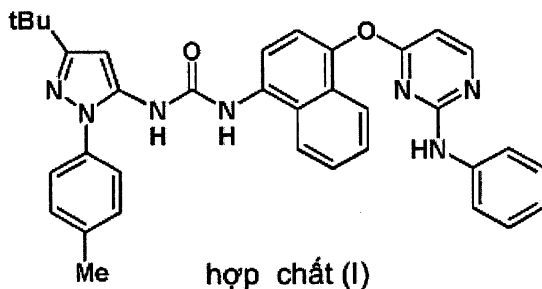
Hợp chất phù hợp có công thức (I) được dùng cho phổi. Do đó, theo sáng chế, dược phẩm chứa hợp chất (I) bộc lộ tùy chọn kết hợp với một hoặc nhiều chất pha

loãng hoặc các chất mang cục bộ chấp nhận được. Sử dụng tại chỗ đối với phổi có thể được đạt được bằng cách sử dụng chế phẩm khí dung. Khí đẩy sol khí thường bao gồm thành phần hoạt tính được tạo huyền phù hoặc được hòa tan trong khí đẩy sol khí thích hợp, chẳng hạn như clorofluorocacbon (CFC) hoặc hydrofluorocacbon (HFC). Khí đẩy CFC thích hợp bao gồm trichloromonofluorometan (khí đẩy 11), diclorotetrafluoro metan (khí đẩy 114), và diclorodifluorometan (khí đẩy 12). Khí đẩy HFC thích hợp bao gồm tetrafluoroetan (HFC-134a) và heptafluoropropan (HFC-227). Khí đẩy thường bao gồm từ 40% đến 99.5% ví dụ từ 40% đến 90% trọng lượng của tổng chế phẩm xông. Công thức có thể bao gồm tá dược chứa chất đồng dung môi (e.g. etanol) và chất hoạt động bề mặt (e.g. lexitin, sorbitan trioleat và chất tương tự). Chế phẩm sol khí được bao gói trong các hộp và liều thích hợp được chia bằng thiết bị van định lượng (ví dụ, như được cung cấp bởi Bepak, Valois hoặc 3M).

Tác dụng tại chỗ đối với phổi cũng có thể đạt được bằng cách sử dụng chế phẩm không có áp suất cao chẳng hạn như dung dịch nước hoặc hỗn dịch. Chế phẩm này có thể được sử dụng bằng một máy xông. Máy xông có thể được sử dụng cầm tay hoặc không cầm tay dùng cho phổi cũng có thể đạt được bằng cách sử dụng chế phẩm bột khô. Chế phẩm bột khô sẽ chứa hợp chất bộc lộ ở dạng chia nhỏ, thường với đường kính khí động lực học lượng trung bình (MMAD) là 1-10 μm . Chế phẩm thường chứa chất pha loãng thích hợp để bôi chẳng hạn như lactoza, thường lớn hơn kích thước hạt, ví dụ, MMAD 50 μm hoặc hơn, ví dụ, 100 μm hoặc hơn. Chất pha loãng thay thế thích hợp để bôi là mannitol. Ví dụ về hệ thống phân tán bột khô bao gồm SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS và CLICKHALER. Hơn nữa, ví dụ về hệ thống máy thở bột khô bao gồm máy thở bột khô ECLIPSE, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, TURBUHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, SKYEHALER, ORIEL, MICRODOSE, ACCUHALER, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR và PROHALER.

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến dược phẩm dạng bột khô dùng để thuốc xông bao gồm:

(i) Hợp chất (I)



đó là 1-(3-*tert*-butyl-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-(2-(phenylamino)pyrimidin-4-yloxy)naphthalen-1-yl)ure hoặc muối được dùng của chúng, bao gồm tất cả chất đồng phân lập thể và chất hỗn biến của chúng, ở dạng hạt (ví dụ, dạng tinh thể rắn B) như thành phần hoạt tính;

(ii) lactoza dạng hạt như chất mang; và

(iii) muối kim loại dạng hạt của axit stearic, chẳng hạn như magie stearat.

Sáng chế cũng đề cập đến thiết bị xông bao gồm một hoặc nhiều liều chế phẩm nói trên.

Hợp chất có công thức (I) có hoạt tính điều trị. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất được mô tả để sử dụng làm thuốc. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất được mô tả ở đây để sử dụng trong điều trị một hoặc nhiều bệnh được đề cập ở trên.

Từ “điều trị” có nghĩa bao gồm sự phòng ngừa cũng như điều trị bệnh.

Hợp chất (I) của sáng chế cũng có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều các thành phần hoạt tính khác, ví dụ, các thành phần hoạt tính thích hợp để điều trị cho các bệnh được đề cập ở trên. Ví dụ, sự kết hợp có thể dùng để điều trị các rối loạn hô hấp bao gồm sự kết hợp với steroid (ví dụ, budesonit, beclometason dipropionat, fluticason propionat, mometason furoat, fluticason furoat), chất chủ vận beta (ví dụ, terbutalin, salbutamol, salmeterol, formoterol) và/hoặc xantin (ví dụ, teophylin). Hoạt chất thích hợp khác bao gồm chống tác động colin, chẳng hạn như tiotropium và chất kháng độc, ví dụ như, nhưng không bị hạn chế với, zanamivir

hoặc oseltamivir, ví dụ, như photphat. Chất kháng độc khác bao gồm peramivir và laninamivir. Thêm các chất tổng hợp thích hợp để điều trị các rối loạn hô hấp bao gồm việc kết hợp với steroid, chẳng hạn như flunisolit, ciclesonit và triamcinolon; chất chủ vận beta như bambuterol, levalbuterol, clenbuterol, fenoterol, broxaterol, indacaterol, reproterol, procaterol và vilanterol; chất đối kháng muscarinic, (ví dụ, ipratropium, tiotropium, oxitropium, glycopyronium, glycopyrolat, aclidinium, trospium) và chất đối kháng leukotrien (ví dụ, zafilukat, pranlukat, zileuton, montelukat). Sẽ được hiểu rằng bất kỳ các thành phần hoạt hóa nói trên có thể được sử dụng ở dạng muối được dụng.

Theo một phương án hợp chất có công thức (I) và thành phần hoạt tính khác cùng được bào chế ở dạng phẩm tương tự. Theo một phương án khác, thành phần hoạt tính khác được sử dụng ở một hoặc nhiều dạng phẩm riêng biệt.

Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến sản phẩm kết hợp bao gồm:

- (A) hợp chất của sáng chế (ví dụ, hợp chất có công thức (I) như được định nghĩa ở trên, hoặc muối được dụng của chúng); và
 - (B) chất điều trị khác,
- trong đó mỗi thành phần (A) và (B) được bào chế trong hỗn hợp với chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Theo khía cạnh này của sáng chế, sản phẩm kết hợp có thể là dược phẩm đơn (kết hợp) hoặc bộ sản phẩm.

Vì vậy, khía cạnh này của sáng chế bao gồm dược phẩm bao gồm hợp chất của sáng chế và chất điều trị khác, trong hỗn hợp với chất pha loãng hoặc chất mang được dụng (trong đó, chế phẩm sau đây được gọi là “chế phẩm kết hợp”).

Nó cũng bao gồm kit chứa các phần bao gồm các thành phần:

- (i) dược phẩm bao gồm hợp chất của sáng chế trong hỗn hợp với chất pha loãng hoặc chất mang được dụng; và
- (ii) dược phẩm bao gồm chất điều trị khác, trong hỗn hợp với chất pha loãng hoặc chất mang được dụng,

trong đó, các thành phần (i) và (ii) được cung cấp ở dạng phù hợp với việc sử dụng kết hợp với nhau.

Do đó, thành phần (i) kit chứa các phần, thành phần (A) được đề cập ở trên kết hợp với chất pha loãng hoặc chất mang được dùng. Tương tự, thành phần (ii) là thành phần (B) đề cập ở trên kết hợp với chất pha loãng hoặc chất mang được dùng.

Chất điều trị khác (ví dụ, thành phần (B) đề cập ở trên) có thể là, ví dụ, bất kỳ thành phần hoạt tính được đề cập ở trên liên quan đến việc điều trị các rối loạn hô hấp.

Dữ liệu được báo cáo dưới đây có liên quan đến các đặc tính kháng virus của hợp chất có công thức (I) đề cập đến bằng chứng cho thấy phương pháp điều trị kháng virus khác kết hợp với hợp chất có công thức (I) có thể là hữu dụng trong việc điều trị hoặc sự phòng bệnh trở nên nặng hơn do virus gây ra (Ví dụ, sự nhiễm virus đường hô hấp) cho các bệnh nhân nhiễm bệnh đường hô hấp, chẳng hạn như, COPD và/hoặc bệnh hen và/hoặc một hoặc nhiều những dấu hiệu được liệt kê ở trên. Vì vậy, theo một khía cạnh đề cập đến hợp chất (I) được sử dụng kết hợp với liệu pháp chống virus, ví dụ như, nhưng không bị hạn chế với, zanamavir hoặc oseltamivir (Ví dụ, oseltamivir photphat) trong việc điều trị hoặc phòng bệnh sự nhiễm virus đường hô hấp ở các bệnh nhân bị nhiễm bệnh đường hô hấp, chẳng hạn như COPD và/hoặc hen.

Các tác giả cũng tin rằng phương pháp điều trị kháng virus khác kết hợp với hợp chất (I) có thể là hữu dụng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh do virus gây ra (Ví dụ, sự nhiễm virus đường hô hấp) ở các bệnh nhân có các bệnh mạn tính khác với bệnh về đường hô hấp, ví dụ, các bệnh chẳng hạn như chứng suy tim sung huyết, bệnh tiểu đường, ung thư, hoặc các bệnh bị nhiễm bởi các bệnh nhân suy giảm miễn dịch, ví dụ, việc ghép sau ghép tạng. Vì vậy, theo một khía cạnh khác đề cập đến hợp chất theo sáng chế được sử dụng kết hợp với liệu pháp chống virus, ví dụ như, nhưng không bị hạn chế với, zanamavir hoặc oseltamivir (ví dụ, oseltamivir photphat), trong điều trị hoặc sự phòng bệnh sự nhiễm virus đường hô hấp ở các bệnh nhân bị nhiễm các bệnh mạn tính chẳng hạn như chứng suy tim sung huyết, bệnh tiểu đường, ung thư, hoặc trong điều kiện bị nhiễm bởi các bệnh nhân suy giảm miễn dịch, ví dụ, việc ghép sau ghép tạng.

Các tác giả cũng tin rằng phương pháp điều trị kháng virus khác kết hợp với hợp chất (I) có thể là hữu dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa sự nghiêm trọng của virus gây ra (ví dụ nhiễm virus đường hô hấp) ở các bệnh nhân mắc bệnh mạn tính khác với bệnh đường hô hấp, ví dụ, các bệnh như xung huyết suy tim, tiểu đường, ung thư, hoặc các bệnh bị nhiễm bởi các bệnh nhân bị ức chế miễn dịch, ví dụ, ghép sau ghép tạng. Như vậy, theo một khía cạnh khác của sáng chế, đề cập đến việc sử dụng hợp chất của sáng chế kết hợp với liệu pháp chống virus, ví dụ như, nhưng không giới hạn ở, zanamavir hoặc oseltamivir (ví dụ, oseltamivir photphat), trong điều trị hoặc phòng nhiễm virus đường hô hấp ở các bệnh nhân bị bệnh mạn tính như xung huyết suy tim, tiểu đường, ung thư, hoặc ở các bệnh bị nhiễm bởi các bệnh nhân bị ức chế miễn dịch, ví dụ, ghép sau ghép tạng

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các chữ viết tắt được sử dụng ở đây được định nghĩa dưới đây (Bảng 1). Bất kỳ chữ viết tắt không xác định được nghĩa để truyền đạt ý nghĩa chung được chấp nhận của chúng.

Bảng 1: các chữ viết tắt

AcOH	axit axetic băng
Aq	thủy dịch
ATP	adenosine-5'-triphosphat
BALF	dung dịch rửa bronchoalveolae
BEGM	dung môi phát triển tế bào biểu mô phế quản
br	phổ rộng
BSA	albumin huyết thanh bò
CatCart®	ống tiêm xúc tác
CDI	1,1-cacbonyl-diimidazol
COPD	bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính
CXCL1	phối tử chemokin (C-X-C motif) 1
d	nhóm đôi
DCM	diclorometan
DMSO	sulfoxit dimetyl
DSC	phân tích nhiệt quét vi sai

d-U937 cells	tế bào U-937 phân chia PMA
DVS	sự hấp thụ hơi bằng lực động
(ES ⁺)	ion hóa phun điện, chế độ tích cực
Et	ethyl
EtOAc	ethyl axetat
FCS	huyết thanh thai bê
FRET	truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang
GSK3 α	chất ức chế glycogen syntaza kinaza 3 α
HBEC	tế bào biểu mô phế quản chính của con người
hr	giờ
HRP	peroxyt cây cải củ cay
HRV	virut mũi của người
ICAM-1	phân tử liên kết giữa các tế bào 1
IR	tia hồng ngoại
JNK	c-Jun N-đầu cuối kinaza
KC	chất hấp dẫn hóa học tế bào keratin
Kd	sự phân rã ổn định
LPS	Lipopolysaccharit
(M+H) ⁺	ion phân tử proton
MAPK	tác nhân gây phân bào protein hoạt hóa protein kinaza
MAPKAP-K2	tác nhân gây phân bào-hoạt hóa protein kinaza-hoạt hóa protein kinase-2
Me	metyl
MeCN	axetonitril
MeOH	metanol
MHz	megahec
min	phút
MIP1 α	protein đại thực bào dễ bị viêm 1 anfa
MMAD	đường kính khí động học động mạch trung bình khối
MOI	đa lây nhiễm
m.p.	điểm tan chảy

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromua
m/z:	tỷ lệ của khối lượng
NMR	cộng hưởng từ hạt nhân (quang phổ)
PBMC	tế bào đơn nhân huyết ngoại vi
PBS	nước muối đệm photphat
Ph	phenyl
PHA	phytohaemagglutinin
PMA	phorbol myristat axetat myristat phorbol
pTSA	axit metylbenzenesulfonic 4
q	nhóm bốn
RT	nhiệt độ trong phòng
RP HPLC	sắc ký lỏng cao áp pha đảo
RSV	virut đường hô hấp
s	mức đơn
sat	bão hòa
SCX	trao đổi cation nền rắn (nhựa)
SDS	sulfat dodecyl natri
S _N Ar	sự thay thế chất thơm nucleophilic
t	nhóm ba
TCID ₅₀	50% mô culture infectious dose
TGA	trọng lượng nhiệt analysis
THF	tetrahydrofuran
TNF α	tumor necrosis factor anfa
XRPD	Nhiều xạ bột tia X

Quy trình chung

Tất cả những nguyên liệu bắt đầu và dung môi thu được từ các nguồn thương mại hoặc được bào chế theo trích dẫn trong tài liệu. Nói cách khác, trừ khi đề cập đến tất cả các phản ứng đã được khuấy. Dung dịch hữu cơ được thường xuyên làm khô trên sulfat magiê khan. Sự hydro hóa được thực hiện trên Thales H-cube theo phản ứng với các bệnh đã nêu. Sắc ký cột được thực hiện trên các hộp silic oxit đóng gói sẵn (230-400 rây, 40-63 μ m) sử dụng lượng cần thiết. SCX đã được mua từ

Supelco và được điều trị với axit hydrochloric 1M ưu tiên sử dụng. Ngoài ra, trừ khi được chỉ ra ở phản ứng hỗn hợp được tinh chế lần đầu tiên được pha loãng với MeOH và tạo ra axitic với vài giọt AcOH. Dung dịch này được nạp tải trực tiếp vào SCX và được rửa với MeOH. Các vật liệu mong muốn sau đó được tách rửa với NH₃ 1% trong MeOH.

Sắc ký lỏng cao áp pha đảo điều chế: cột Agilent Scalar C18, 5 μ m (21,2 x 50 mm), tốc độ dòng 28 mL/phút tách rửa với H₂O-MeCN gradient chứa 0,1% axit formic hơn 10 phút sử dụng Tách sóng UV ở 215 và 254 nm. Thông tin gradient: 0,0-0,5 phút; 95% H₂O-5% MeCN; 0,5-7,0 phút; nghiêng từ 95% H₂O-5% MeCN đến 5% H₂O-95% MeCN; 7,0-7,9 phút; được giữ ở 5% H₂O-95% MeCN; 7,9-8,0 phút; quay về 95% H₂O-5% MeCN; 8,0-10,0 phút; được giữ ở 95% H₂O-5% MeCN.

Phương pháp phân tích

Sắc ký lỏng cao áp pha đảo: (Phương pháp 1): Cột Agilent Scalar C18, 5 μ m (4,6 x 50 mm) hoặc nước XBridge C18, 5 μ m (4,6 x 50 mm) tốc độ dòng 2,5 mL/phút tách rửa với gradien H₂O-MeCN chứa hoặc axit formic 0,1% (Phương pháp 1 axitic) hoặc NH₃ (Phương pháp 1 cơ bản) trên 7 phút sử dụng tách sóng UV ở 215 và 254 nm. Thông tin gradient: 0,0-0,1 phút, 95% H₂O-5% MeCN; 0,1-5,0 phút, nghiêng từ 95% H₂O-5% MeCN đến 5% H₂O-95% MeCN; 5,0-5,5 phút, được giữ ở 5% H₂O-95% MeCN; 5,5-5,6 phút, được giữ ở 5% H₂O-95% MeCN, tốc độ dòng tăng đến 3,5 mL/phút; 5,6-6,6 phút, được giữ ở 5% H₂O-95% MeCN, tốc độ dòng 3,5 mL/phút; 6,6-6,75 phút, trở lại 95% H₂O-5% MeCN, tốc độ dòng 3,5 mL/phút; 6,75-6,9 phút, được giữ ở 95% H₂O-5% MeCN, tốc độ dòng 3,5 mL/phút; 6,9-7,0 phút, được giữ ở 95% H₂O-5% MeCN, tốc độ dòng giảm đến 2,5 mL/phút.

Sắc ký lỏng cao áp pha đảo: (Phương pháp 2): Cột Agilent Extend C18, 1,8 μ m (4,6 x 30 mm) ở 40°C; tốc độ dòng 2,5-4,5 mL/phút tách rửa với H₂O-MeCN gradient chứa 0,1% axit formic hơn 4 phút sử dụng tách sóng UV ở 254 nm. Thông tin gradient: 0-3,00 phút, nghiêng từ 95% H₂O-5% MeCN đến 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 phút, được giữ ở 5% H₂O-95% MeCN, tốc độ dòng tăng đến 4,5 mL/phút; 3,01-3,50 phút, được giữ ở 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 phút, trở lại 95% H₂O-5% MeCN, tốc độ dòng giảm 3,50 mL/phút; 3,60-3,90 phút, được giữ ở 95% H₂O-

5% MeCN; 3,90-4,00 phút, được giữ ở 95% H₂O-5% MeCN, tốc độ dòng giảm 2,5 mL/phút.

Kính hiển vi ¹H NMR: Phổ được thu nhận trên phổ kế Bruker Avance III ở 400 MHz sử dụng dung môi không bị chặn bởi phần dư để tham khảo.

Sự hấp thụ hơi bằng lực động: Các sơ đồ thu được từ sử dụng Hệ thống đo bề mặt (Surface Measurement Systems) mô hình hấp thụ hơi nước động lực DVS-1 sử dụng khoảng 10 mg mẫu. Sự thay đổi trọng lượng được tường trình với độ ẩm không khí là 25°C và được xác định sử dụng các thông số sau: làm khô: 60 phút với nitơ khô; trạng thái cân bằng: 60 phút/giai đoạn; khoảng thời gian dữ liệu: 0,05% hoặc 2,0 phút. Điểm đo độ ẩm tương đối [RH %] điểm đo như sau:

Giai đoạn thứ nhất: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5

Giai đoạn thứ hai: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0.

Sự nhiễu xạ bột tia X: Đồ thị thu được trên máy đo nhiễu xạ PANalytical (Philips) X'PertPRO MPD được trang bị với ống Cu LFF tia X (45 kV; 40 mA; Bragg-Brentano; giai đoạn xoay) và được thu được sử dụng bức xạ Cu K α theo các điều kiện đo dưới đây: chế độ quét: liên tục; phạm vi quét: từ 3 đến 50° 2 θ ; kích thước bước: 0,02°/bước; đếm thời gian: 30 giây/bước; thời gian xoay vòng: 1 giây; đường chùm tia tới: chương trình. Khe phân kỳ: 15 mm; khe Soller slit: 0,04 rad; mặt nạ chùm: 15 mm; khe chống tán xạ: 1°; dao chùm: +; rãnh chùm nhiễu xạ: khiên chống tán xạ dài: +; khe Soller: 0,04 rad; bộ lọc Ni: +; máy dò: X'Celerator. Các mẫu được bảo chế bằng việc trải rộng trên khay mẫu không nền.

Quang phổ hồng ngoại: tổng hệ số phản xạ nhỏ (microATR) được sử dụng và mẫu được phân tích sử dụng các phụ kiện microATR thích hợp và các điều kiện được đánh giá sau đây: thiết bị: phổ kế Thermo Nexus 670 FTIR; số lần quét: 32; sự phân giải: 1 cm⁻¹; khoảng bước sóng: từ 4000 đến 400 cm⁻¹; máy dò: DTGS với cửa sổ KBr; bộ tách chùm: Ge trên KBr; phụ kiện micro ATR: Harrick Split Pea với tinh thể Si.

Phép đo nhiệt lượng quét khác biệt: dữ liệu thu được trên thiết bị TA Q1000 MTDSC được trang bị với chi tiết làm mát RCS. Thông thường 3mg của mỗi hợp chất, trong chảo mẫu thiết bị TA nhôm chuẩn, được làm nóng lên ở nhiệt độ 10°C/phút từ 25°C đến 300°C. Nitơ sạch ở 50 mL/phút được duy trì trên mẫu.

Phân tích lượng nhiệt: dữ liệu được thu được trên máy ghi nhiệt thiết bị TA Q500. Thông thường, 10 mg của mỗi mẫu được truyền vào chảo nhôm được cân trước và được làm nóng lên đến 20°C/phút từ nhiệt độ môi trường xung quanh đến 300°C hoặc < 80% trọng lượng] trừ khi có quy định khác.

Sự ổn định hóa học bằng HPLC: Các phân tích được thực hiện trên cột Waters Xbridge C₁₈ (3,0 x 150mm; 3,5µm) sử dụng các điều kiện thực hiện dưới đây: nhiệt độ cột: 40°C; nhiệt độ mẫu: 5°C; tốc độ dòng: 0,45 mL/phút; thể tích tiêm: 7µL; Tách sóng UV ở 260nm; hợp phần pha di động bao gồm Pha A: 10mM axetat amoni + 0,1%, axit trifluoroaxetic trong nước và Pha B: axetonitril, sử dụng gradien được xác định bởi các thông số dưới đây (Bảng 2).

Bảng 2: Điều kiện Gradien đối với các nghiên cứu sự ổn định hóa học bằng HPLC.

Dung môi rửa giải	% hợp phần tại thời gian hoạt động (phút)				
	0	20	25	26	32
Pha A	70	0	0	70	70
PhaB	30	100	100	30	30

Các phương pháp thử nghiệm đối với thử nghiệm sinh học

Thử nghiệm ức chế Enzym

Các hoạt động liên kết enzym kinaza của các hợp chất được bộc lộ ở đây được xác định sử dụng thử nghiệm độc quyền để đánh giá sự cạnh tranh hướng vị trí hoạt hóa liên kết với phối tử được giữ cố định (Fabian, M.A. *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 2005, 23:329-336). Các thử nghiệm này được dẫn bởi DiscoverX

(formerly Ambit; San Diego, CA). Giá trị K_d (giá trị phân rã ổn định) được tính toán như chỉ số ái lực của các hợp chất đối với mỗi kinaza.

Các thử nghiệm ức chế Enzym

Các hoạt động ức chế enzym của các hợp chất được bộc lộ ở đây được xác định bởi FRET sử dụng peptit tổng hợp được ghi nhãn cho cả chất cho và chất nhận flophore (Z-LYTE, Invitrogen Ltd., Paisley, UK).

Chất ức chế enzym p38 MAPK α

Các hoạt tính ức chế của các hợp chất thử nghiệm đối với p38 MAPK α đồng dạng (MAPK14: Invitrogen), được đánh giá trực tiếp bằng việc xác định mức hoạt hóa/ phosphoryl hóa của phân tử xuôi dòng, MAPKAP-K2. Protein p38 MAPK α (80ng/mL, 2,5 μ L) được kết hợp với Hợp chất thử nghiệm (2,5 μ L hoặc của 4 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,04 μ g/mL hoặc 0,004 μ g/mL) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng Dung dịch hỗn hợp (2,5 μ L) của đích không hoạt động p38 α MAPKAP-K2 (Invitrogen, 600 ng/mL) và peptit FRET (8 μ M; đích phosphoryl hóa đối với MAPKAP-K2) sau đó được bổ sung và phản ứng kinaza đã được bắt đầu bằng cách bổ sung ATP (40 μ M, 2,5 μ L). Hỗn hợp này được ủ trong 1 giờ với RT. Chất phản ứng phát triển (protease, 5 μ L) được bổ sung trong 1 giờ để phát hiện trong đọc vi đĩa huỳnh quang (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Chất ức chế enzym p38 MAPK γ

Các hoạt tính ức chế của các hợp chất của sáng chế chống p38MAPK γ (MAPK12: Invitrogen), được đánh giá theo cách tương tự được mô tả trên đây. Enzym (800 ng/mL, 2,5 μ L) được ủ với Hợp chất thử nghiệm (2,5 μ L ở 4 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, hoặc 0,004 μ g/mL) trong 2 giờ ở RT. FRET peptit (8 μ M, 2.5 μ L), và tiếp đó thêm dung dịch ATP (2,5 μ L, 400 μ M) vào hỗn hợp enzym / Hợp chất và được ủ trong 1 giờ. Sự phát triển chất phản ứng (protease, 5 μ L) được bổ sung trong 1 giờ trước khi phát hiện trong đọc vi đĩa huỳnh quang (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

Chất ức chế enzym c-Src và Syk

Các hoạt tính ức chế của các hợp chất của sáng chế đối với enzym c-Src và Syk (Invitrogen), được đánh giá theo cách tương tự như được mô tả trên đây. Enzym

có liên quan (3000ng/mL hoặc 2000ng/mL tương ứng, 2,5 μ L) được ủ với Hợp chất thử nghiệm (hoặc 4 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, hoặc 0,004 μ g/mL, 2,5 μ L) trong 2 giờ với RT. Peptit FRET (8 μ M, 2,5 μ L), và các dung dịch ATP thích hợp (2,5 μ L, 800 μ M đối với c-Src, và 60 μ M ATP đối với Syk) sau đó được bổ sung vào enzym/hỗn hợp hợp chất và được ủ trong 1 giờ. Sự phản ứng phát triển (proteasea, 5 μ L) được bổ sung trong 1 giờ để phát hiện ở đọc vi đĩa huỳnh quang (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Chất ức chế enzym GSK 3 α

Các hoạt tính ức chế của các hợp chất thử nghiệm đối với enzym đồng dạng GSK 3 α (Invitrogen), được đánh giá bằng việc xác định mức hoạt hóa/ phosphoryl hóa của peptit đích. Protein GSK3- α (500ng/mL, 2,5 μ L) được trộn với Hợp chất thử nghiệm (2,5 μ L hoặc với 4 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, hoặc 0,004 μ g/mL) trong 2 giờ với RT. Peptit FRET (8 μ M, 2,5 μ L), là phosphoryl hóa đích đối với GSK3 α , và ATP (40 μ M, 2,5 μ L) sau đó được bổ sung với enzym / Hợp chất hỗn hợp và hỗn hợp thu được được ủ trong 1 giờ. Phản ứng phát triển (proteasea, 5 μ L) được bổ sung trong 1 giờ để phát hiện trong đọc vi đĩa huỳnh quang (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Ở tất cả các trường hợp, chỉ có peptit không photphoryl hóa phân cắt proteaza ở vị trí riêng biệt và loại trừ tín hiệu FRET. Mức phosphoryl hóa của mỗi phản ứng được đo có sử dụng tỷ lệ truyền cumarin (thể cho) trên sự truyền floresxein (thể nhận), đối với tỷ lệ thấp chỉ định cho mức phosphoryl hóa cao và tỷ lệ cao chỉ định với mức phosphoryl hóa thấp. Phần trăm ức chế của mỗi phản ứng được tính liên quan đến sự kiểm soát không ức chế và nồng độ ức chế 50% (giá trị IC₅₀) sau đó được tính từ đường cong nồng độ phản ứng.

Thử nghiệm tế bào

Phản ứng LPS TNF α / IL-8 giải phóng ở tế bào d-U937

Tế bào U937, đường tế bào bạch cầu đơn nhân to ở người, được phân biệt với tế bào tủy đại thực bào bằng việc ủ với PMA (100ng/mL) từ 48 đến 72 giờ. Các tế bào được ủ trước với nồng độ cuối của Hợp chất thử nghiệm trong 2 giờ và sau đó được kết hợp với LPS (0,1 μ g/mL; từ *E. Coli*: O111:B4, Sigma) trong 4 giờ. Dịch nổi

trên mặt được gom lại để xác định nồng độ TNF α và IL-8 bằng kẹp ELISA (Duo-set, hệ thống R&D). Chất ức chế của sản phẩm TNF α được tính là phần trăm thu được bằng 10 μ g/mL BIRB796 ở mỗi nồng độ Hợp chất thử nghiệm qua sự so sánh với sự kiểm soát chất dẫn. Nồng độ tương đối hiệu quả 50% (REC₅₀) được xác định từ đường cong nồng độ tương ứng thu được. Chất ức chế của sản phẩm IL-8 được đánh giá ở mỗi nồng độ Hợp chất thử nghiệm bằng việc so sánh với sự kiểm soát chất dẫn. Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) được xác định từ đường cong nồng độ tương ứng thu được.

Phản ứng giải phóng TNF α kích thích bởi LPS ở các tế bào THP-1

Các tế bào THP-1, đường tế bào bạch cầu đơn nhân to ở người, được phản ứng với 3 μ g/mL of LPS (từ *E. Coli*; 0111:B4, Sigma) trong 4 giờ và các dịch nổi thu được đối với việc xác định nồng độ TNF α bằng kẹp ELISA (Duo-set, R&D systems). Chất ức chế sản phẩm TNF α được đánh giá với mỗi nồng độ qua sự so sánh với sự kiểm soát chất dẫn. Nồng độ chất ức chế 50% (IC₅₀) được xác định từ đường cong nồng độ tương ứng thu được.

Phản ứng Poly I:C ICAM-1 được biểu hiện ở các tế bào BEAS2B

Poly I:C được sử dụng trong các nghiên cứu này như mẫu thử nghiệm, virus RNA giả. Hỗn hợp Poly I:C-Oligofectamin (1 μ g/mL Poly I:C, $\pm$ 2% Oligofectamin, 25 μ L; Invivogen Ltd., San Diego, CA, và Invitrogen, Carlsbad, CA, tương ứng) được truyền vào các tế bào BEAS2B (các tế bào biểu mô phế quản của người, ATCC). Các tế bào được ủ trước với nồng độ cuối của các hợp chất thử nghiệm trong 2 giờ và mức biểu hiện ICAM-1 trên bề mặt tế bào được xác định bằng ELISA gốc tế bào. Tại điểm thời gian 18 giờ sau truyền nhiễm poly I:C, các tế bào được liên kết với 4% fomandehyt ở PBS (100 μ L) và sau đó chất peroxidaza nội sinh được dập tắt bằng việc bổ sung chất đệm rửa (100 μ L, 0,05% Tween ở PBS: PBS-Tween) chứa 0,1% azit natri và 1% peroxit hydro. Các tế bào được rửa với chất đệm rửa (3 x 200 μ L). Và sau khi phong bế bề chứa với 5% sữa ở PBS-Tween (100 μ L) trong 1 giờ, các tế bào được ủ với kháng thể kháng phân tử liên kết giữa các tế bào 1 ở người (50 μ L; Công nghệ tín hiệu tế bào, Danvers, MA) ở 1% BSA PBS qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

Các tế bào được rửa bằng PBS-Tween (3 x 200 μ L) và được ủ với kháng thể thứ cấp (100 μ L; kháng tiếp hợp HRP ở thỏ IgG, Dako Ltd., Glostrup, Denmark). Các tế bào tiếp đó được ủ với chất nền (50 μ L) từ 2 đến 20 phút, sau khi được bổ sung dung dịch dừng phản ứng (50 μ L, H₂SO₄ 1N). Dấu hiệu ICAM-1 được phát hiện bằng cách đọc và đọc mức độ hấp thụ ở 450nm với bước sóng tham chiếu 655nm sử dụng quang phổ. Các tế bào sau đó được rửa bằng PBS-Tween (3 x 200 μ L) và tổng lượng tế bào ở mỗi bể chứa được xác định bằng cách đọc mức độ hấp thụ ở 595nm sau khi nhuộm màu tím pha lê (50 μ L của 2% dung dịch ở PBS) và tách rửa 1% dung dịch SDS (100 μ L) trong nước được chưng cất. Việc đọc OD 450-655 được đo được hiệu chỉnh với lượng tế bào bằng cách chia nhỏ với việc đọc OD595 ở mỗi bể chứa. Biểu hiện sự ức chế của ICAM-1 được đánh giá ở mỗi nồng độ Hợp chất thử nghiệm qua việc so sánh với việc kiểm soát chất dẫn. Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) được xác định từ đường cong nồng độ tương ứng thu được.

Thử nghiệm phân bào tế bào

Tế bào đơn nhân huyết ngoại vi (PBMCs) từ các đối tượng khỏe mạnh được tách ra từ máu thuần chủng (Quintiles, London, UK) sử dụng gradien mật độ (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Poole, UK). PBMC (3 triệu tế bào ở mỗi mẫu) sau đó được điều trị với 2% PHA (Sigma-Aldrich, Poole, UK) trong 48 giờ, tiếp theo phơi trong 20 giờ để thay đổi nồng độ của hợp chất thử nghiệm. Được 2 giờ khi lấy mẫu, PBMCs được điều trị với chất demecolcin (0,1 μ g/mL; Invitrogen, Paisley, UK,) để hãm các tế bào ở pha giữa. Để quan sát các tế bào phân bào, PBMCs được thấm thấu và cô đặc bằng cách bổ sung Intraprep (50 μ L; Beckman Coulter, France), và được nhuộm với histon kháng phospho 3 (0,26 ng/L; #9701; Cell Signalling, Danvers, MA) và propidium iodua (1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Poole, UK,) như được mô tả trước đó (Muehlbauer P.A. và Schuler M.J., *Mutation Research*, 2003, **537**:117-130). Huỳnh quang được quan sát sử dụng tế bào kế tiến trình ATTUNE (Invitrogen, Paisley, UK), cho vào tế bào lympho. Phần trăm chất ức chế của phân bào được đánh giá đối với mỗi cách điều trị liên quan đến chất dẫn (DMSO 0,5%) trong điều trị.

Giải phóng IL-8 dựa trên phản ứng của Rhinovirus và sự biểu hiện của ICAM-1

Virut mũi ở người RV16 được thu được ở Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (Manassas, VA). Virut giống được cấy chất lây nhiễm các tế bào Hela với HRV đến khi đạt 80% các tế bào thành bệnh tế bào.

Các tế bào BEAS2B cho nhiễm HRV với MOI 5 và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 33°C cùng với lắc nhẹ để thúc đẩy sự hấp thụ. Các tế bào sau đó được rửa bằng PBS, được bổ sung lớp giữa sạch và các tế bào được ủ thêm 72 giờ. Các dịch nổi thu được từ thử nghiệm của nồng độ IL-8 có sử dụng DuoSet ELISA để phát triển kit (R&D systems, Minneapolis, MN).

Sự biểu hiện mức độ bề mặt tế bào ICAM-1 được xác định bởi tế bào ELISA ELISA. Sau 72 giờ nhiễm khuẩn, các tế bào được làm ổn định với 4% focmaldehyt ở PBS. Sau khi làm nguội chất peroxidaza nội sinh bằng cách bổ sung 0,1% axit natri và 1% hydro peroxit, các bể chứa được rửa bằng chất đệm rửa (0,05% Tween ở PBS: PBS-Tween). Sau khi phong bế tốt bằng 5% sữa ở PBS-Tween trong 1 giờ, các tế bào được ủ với kháng thể kháng ICAM-1 ở người trong 5% BSA PBS-Tween (1:500) qua đêm. Các bể chứa được rửa bằng PBS-Tween và được ủ với kháng thể thứ cấp (kháng tiếp hợp HRP ở thỏ IgG, Dako Ltd.). Tín hiệu ICAM-1 được nhận biết bằng cách bổ sung chất nền và đọc ở 450nm với bước sóng tham chiếu 655nm sử dụng quang phổ. Các bể chứa sau đó được rửa bằng PBS-Tween và tổng số tế bào ở mỗi bể chứa được xác định bằng phương thức đọc mức độ hấp thụ ở 595nm sau khi Nhuộm màu tím pha lê và giải hấp bằng 1% dung dịch SDS. Phương pháp đọc được đánh giá qua OD₄₅₀₋₆₅₅ được điều chỉnh đối với lượng tế bào bằng cách chia phần đọc OD₅₉₅ ở mỗi bể chứa. Các hợp chất được bổ sung 2 giờ trước khi nhiễm HRV và 2 giờ sau khi nhiễm khi HRV không nhiễm được rửa đi.

Sự đánh giá của tế bào MRC5 trong CPE gây ra HRV16

Các tế bào MRC-5 đã bị nhiễm HRV16 với MOI của 1 trong DMEM chứa 5% FCS và 1.5mM MgCl₂, tiếp theo sau là quá trình ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 33°C để đẩy mạnh quá trình hút bám. Các chất nổi trên bề mặt được hút ra, và sau đó dung môi sạch được bổ sung vào sau khi được ủ 4 ngày. Ở nơi thích hợp, các tế bào được ủ trước với hợp chất hoặc DMSO trong 2 giờ, và các hợp chất và DMSO lại được bổ sung sau khi đã được làm sạch virut.

Chất nổi trên bề mặt được hút ra và được ủ với dung dịch metylen màu xanh

(100 μ L, 2% formaldehyt, 10% metanol và 0,175% Metylen màu xanh) trong 2 giờ ở RT. Sau khi làm sạch, 1% SDS trong nước được chưng cất (100 μ L) được bổ sung cho mỗi bể chứa, và các đĩa được lắc nhẹ từ 1 đến 2 giờ tùy theo cách mức độ hấp thụ ở 660nm. Phần trăm sự ức chế đối với mỗi bể chứa đã được tính toán. Giá trị IC₅₀ được tính từ đường cong nồng độ phản ứng được tạo ra từ chuỗi chất pha loãng của các hợp chất thử nghiệm.

Các tế bào biểu mô phế quản chính trong virus RSV tải trong ống nghiệm.

Các tế bào biểu mô phế quản của người thường (NHBE) phát triển ở các tế bào tốt 96 đã bị nhiễm RSV A2 (Strain A2, HPA, Salisbury, UK) với MOI của 0.001 ở dung môi LHC8:RPMI-1640 (50:50) chứa 15mM magiê clorua và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C để hút bám. Các tế bào sau đó được làm sạch với PBS (3 x 200 μ L), chất dung môi sạch (200 μ L) được bổ sung và quá trình ủ được tiếp tục trong 4 ngày. Ở nơi thích hợp, các tế bào được ủ trước với hợp chất hoặc DMSO trong 2 giờ, và sau đó lại được bổ sung sau khi đã được làm sạch virus.

Các tế bào được ổn định 4% formaldehyt trong dung dịch PBS (50 μ L) trong 20 phút, được làm sạch với chất đệm rửa (3 x 200 μ L; PBS bao gồm 0,5% BSA và 0,05% Tween-20) và ủ với dung dịch phong bế (5% sữa đặc trong PBS) trong 1 giờ. Các tế bào sau đó được làm sạch với chất đệm rửa (3 x 200 μ L) và được ủ trong 1 giờ với nhiệt độ trong phòng với kháng thể protein dung hợp F kháng RSV (2F7) (40 μ L; vô tính đơn ở chuột, lô số 798760, mục lục số. ab43812, Abcam) trong 5% BSA ở PBS-tween). Sau khi làm sạch, các tế bào được ủ với dung dịch kháng thể thứ cấp liên hợp HRP (50 μ L) trong 5% BSA ở PBS-Tween (lô số. 00053170, mục lục số. P0447, Dako) và sau đó chất nền TMB (50 μ L; gói chất phản ứng nền, lô số. 269472, mục lục số. DY999, R&D Systems, Inc.) được bổ sung vào. Phản ứng này dừng lại do bổ sung H₂SO₄ 2N (50 μ L) và tín hiệu hiệu quả được xác định phương pháp đo màu (OD: 450nm với bước sóng tham chiếu 655nm) ở đầu đọc vi đĩa (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

Các tế bào sau đó được làm sạch và 2.5% dung dịch tinh thể màu tím (50 μ L; lô số. 8656, mục lục số. PL7000, Pro-Lab Diagnostics) được phủ trong 30 phút. Sau khi làm sạch với chất đệm rửa, 1% SDS trong nước được chưng cất (100 μ L) được bổ sung cho mỗi bể chứa, và các đĩa được lắc nhẹ trên thiết bị lắc trong 1 giờ tùy theo

phương thức đọc mức độ hấp thụ ở 595nm. Phương pháp đọc được đánh giá OD₄₅₀₋₆₅₅ được điều chỉnh để lượng tế bào chia OD₄₅₀₋₆₅₅ bằng phương pháp đọc OD₅₉₅. Phần trăm ức chế đối với mỗi bể chứa được đánh giá và giá trị IC₅₀ được tính toán theo đường cong nồng độ phản ứng được tạo ra từ chuỗi chất pha loãng của hợp chất.

Kết quả của các hợp chất thử nghiệm trên Khả năng sống của tế bào: Thử nghiệm MTT

Các tế bào U937 khác biệt được ủ trước với mỗi hợp chất thử nghiệm (nồng độ cuối 1µg/mL hoặc 10µg/mL trong 200µL dung môi được chỉ ra dưới đây) dưới hai protocol: đầu tiên trong 4 giờ với 5% FCS RPMI1640 dung môi và thứ hai với 10% FCS RPMI1640 dung môi trong 24 giờ. Các dịch nổi được thay thế bằng dung môi mới (200µL) và dung dịch gốc MTT (10µL, 5mg/mL) được bổ sung cho mỗi bể chứa. Sau khi ủ 1 giờ, chất dung môi được loại ra, DMSO (200µL) được bổ sung cho mỗi bể chứa và các đĩa được dung nhẹ trong 1 giờ tùy theo đọc mức độ hấp thụ với 550nm. Phần trăm mất khả năng sống của tế bào được tính với mỗi bể chứa liên quan đến chất dẫn (0,5% DMSO) điều trị. Do vậy, biểu hiện tăng khả năng sống của tế bào đối với thuốc điều trị liên quan đến chất dẫn được lập bảng phần trăm âm.

Sản phẩm Xytokin ở các đại thực bào đờm từ COPD.

Các bệnh nhân bị COPD bị hít phải dung dịch khí dung 3% (w/v) nước muối ưu trương sử dụng máy xông siêu âm (Devlbiss, Carthage, MO) với sự hô hấp khí lưu không trong 5 phút. Thủ thuật này được lặp lại tối đa là ba lần cho đến khi thu được đủ chất đờm. Các mẫu chất đờm được làm đồng nhất và được trộn mạnh có sử dụng thiết bị trộn xoáy trong 0,02% v/v dung dịch ditiotritol (DTT). Các mẫu được tạo huyền phù trước trong PBS (40 mL) tiếp theo bằng máy ly tâm 1500 rpm ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút để thu được viên tế bào đờm. Các viên tế bào này được làm sạch hai lần với PBS (40mL). Các tế bào đờm sau đó được tạo huyền phù trước trong đại thực bào trung bình trong huyết thanh tự do (đại thực bào-SFM, Công nghệ cuộc sống, Paisley, UK; để thu được 2x10⁶/bể chứa trong 24 đĩa tốt) chứa 20 U/mL penicillin, 0,02 mg/mL streptomycin và 5µg/mL amphotericin B và được gieo hạt trên đĩa bể chứa 96 liên kết cao, sau đó được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C và ở 5% CO₂ để cho các đại thực bào tiếp xúc với đáy của đĩa. Các tế bào trên đĩa được rửa

với đại thực bào-SFM sạch (200 μ L/bể chứa) để loại bỏ các bạch cầu trung tính và các tế bào nhiễm bẩn khác. Các tế bào dính (phần lớn đại thực bào đốm) trên đĩa được sử dụng nhiều cho phân tích. Cảm ứng và cách ly đốm được dẫn trong Đơn vị nghiên cứu thuốc Quintiles (Quintiles Drug Research Unit) ở Bệnh viện Guys và đạo đức được xác nhận và bản thỏa thuận được thông báo bằng văn bản do Quintiles cấp.

Ở nơi phù hợp, 1 μ L dung dịch chứa hoặc hợp chất thử nghiệm hoặc vật phẩm tham khảo ở nồng độ quy định hoặc thay đổi 1 μ L DMSO theo sự kiểm soát chất dẫn được bổ sung cho mỗi bể chứa (200 μ L trong chất dung môi) và các tế bào được ủ trong 2 giờ. Các tế bào được kích thích bởi dung dịch LPS (50 μ L, nồng độ cuối: 1 μ g/mL) và được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Các dịch nổi sau đó được thu hồi và được giữ ở nhiệt độ -80°C. Bộ Millipore's luminex cũng được sử dụng để đánh giá bốn phân tích. Sau khi làm tan các chất nổi bề mặt, hạt kháng thể từ được ghép và ủ trong đĩa bể chứa 96 theo mẫu chuẩn, dung dịch nền hoặc khối lượng thích hợp của mẫu thử nghiệm qua đêm được lắc ở nhiệt độ 4°C. Sau khi được rửa hai lần với 200 μ L chất đệm rửa cung cấp bởi bộ được phẩm ở mỗi bể chứa sử dụng máy rửa đĩa từ, các hạt được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với 25 μ L của dung dịch kháng thể kết hợp biotin được cung cấp bởi bộ được phẩm kèm với lắc. Dung dịch streptavidin được bổ sung trong 30 phút được lắc với RT. Sau khi rửa với 200 μ L chất đệm rửa ở mỗi bể chứa, các hạt được tạo huyền phù trước trong dịch vô (150 μ L) và được phân tích ngay. Mức độ của mỗi phân tích trong các dịch nổi được tính có sử dụng phần mềm Xcel Fit với sự cân bằng phân số 4 hoặc 5 có sử dụng từng đường cong chuẩn. Các chất ức chế của mỗi sản phẩm phân bào được tính toán ở từng nồng độ qua sự so sánh với sự kiểm soát chất dẫn. Giá trị IC₅₀ được xác định từ đường cong ức chế nồng độ sử dụng XL-Fit (idbs, Guildford, UK)

Sản phẩm Xytokin ở các tế bào biểu mô phế quản chính từ COPD.

Các tế bào biểu mô đường khí đạo chính thu được từ các bệnh nhân bị COPD được mua từ Asterand (Royston, UK), và được duy trì trong dung môi phát triển tế bào biểu mô phế quản đã được bào chế bằng cách trộn với LHC8 (Invitrogen) (500 mL), với LHC9 (Invitrogen) (500mL) và 3 μ L dung dịch axit retinoic (5mg/mL trong DMSO tinh khiết. Chất dung môi được loại bỏ bằng cách hút và BEGM sạch (200 μ L) được bổ sung cho mỗi bể chứa. Tại nơi thích hợp, 1 μ L dung dịch của hợp

chất thử nghiệm ở nồng độ quy định hoặc 1 μ L DMSO như sự kiểm soát chất dẫn được bổ sung và các tế bào được ủ trong 2 giờ. Các tế bào được kích thích với TNF α (50 μ L; nồng độ cuối 50ng/mL) và sau đó được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Các dịch nổi sau đó được thu về và được giữ ở nhiệt độ -20°C.

Cấp độ của IL-6 và IL-8 được xác định bằng ELISA sử dụng R&D Systems' Human IL-6 và IL-8 DuoSet® Elisa Kits. Chất ức chế của sản phẩm IL-6 và IL-8 được tính ở mỗi nồng độ bằng sự so sánh sự kiểm soát chất dẫn. Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) được xác định từ đường cong nồng độ tương ứng thu được có sử dụng XL-Fit (idbs, Guildford, UK).

Thử nghiệm trên cơ thể: tác dụng của thuốc tới cơ thể và hoạt tính kháng viêm

Sự tích lũy bạch cầu trung tính kích thích LPS ở chuột

Chuột Balb/c bị bỏ đói được định lượng liều bằng đường nội khí quản hoặc bằng vật dẫn, hoặc chất thử ở số lần biểu thị (nằm trong khoảng từ 2 đến 8 giờ) trước khi kích thích tính dễ viêm phản ứng với ứng dụng của sự thay đổi LPS. Ở T = 0, chuột được đặt vào buồng tiếp xúc và được tiếp xúc với LPS (dung dịch 7,0mL, 0,5mg/mL trong PBS) trong 30 phút). Sau hơn 8 giờ, chuột bị gây mê, khí quản của chúng được thông dò và BALF được trích bằng cách tiêm truyền và sau đó rút khỏi phổi của chúng 1,0mL PBS qua ống thông khí quản. Tổng lượng bạch cầu và bạch cầu khác nhau ở các mẫu BALF được đánh giá có sử dụng huyết tốc kế Neubaur. Chất bản Xytospin của các mẫu BALF đã được bào chế bằng máy ly tâm ở 200 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và được nhuộm với hệ thống nhuộm DiffQuik (Dade Behring). Các tế bào được đếm có sử dụng kính hiển vi ngâm dầu. Dữ liệu đối với con số trung tính ở BAL được thấy như phương thức $\pm$ S.E.M. (phương thức lỗi chuẩn). Phần trăm ức chế của sự tích lũy bạch cầu trung tính được tính cho mỗi cách điều trị liên quan đến chất dẫn điều trị.

Mẫu khói thuốc lá

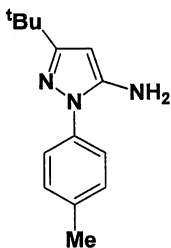
Chuột A/J (chuột đực, 5 tuần tuổi) được cho hít khói thuốc lá (4% khói thuốc lá, bị loãng trong không khí) trong 30 phút/ngày trong thời gian 11 ngày sử dụng Hệ thống thiết bị xông khói thuốc lá đối với các động vật còn nhỏ (Model SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan). Các chất thử nghiệm được theo dõi bên

trong mũi (35 μ L dung dịch ở 50% DMSO/PBS) một lần một ngày trong thời gian 3 ngày sau khi tiếp xúc với khói thuốc lá. 12 giờ sau liều thuốc cuối cùng, mỗi con vật bị gây mê, khí quản được thông dò và dịch rửa phế quản (BALF) được tập hợp. Số các đại thực bào phổi và các bạch cầu trung tính được xác định bằng phân tích FACS (EPICS[®] ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) có sử dụng kháng thể MOMA2 kháng chuột (đại thực bào) hoặc kháng thể 7/4 kháng chuột (neutrophil). BALF was centrifuged và các dịch nổi được gom lại. Cấp độ của keratinoxyl chemoattractant (KC; CXCL1) ở BALF được định lượng sử dụng bộ Quentikine[®] chuột KC ELISA (Hệ thống R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Ví dụ 1- điều chế hợp chất (I)

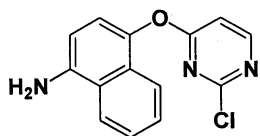
Các chất trung gian sau được sử dụng để bào chế hợp chất (I) của sáng chế đã được mô tả trên đây và đã được bào chế sử dụng các thủ tục có trong các tài liệu tham khảo trích dẫn dưới đây (Bảng 3).

Bảng 3: Các chất trung gian được mô tả trên đây.

Chất trung gian	Cấu trúc	Tên, dữ liệu LCMS và Tài liệu tham khảo
A		3- <i>tert</i> -butyl-1- <i>p</i> -tolyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-amin.
		R ^t 2.46 phút (Phương pháp cơ bản 1); m/z 230 (M+H) ⁺ , (ES ⁺). Cirillo, P. F. <i>et al.</i> , WO 2000/43384, 27 Jul 2000.

4-((2-cloropyrimidin-4-yl)oxy)naphthalen-1-amin.

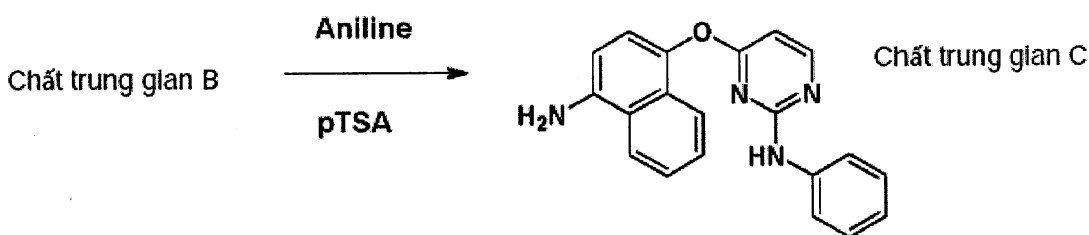
B



R^t 1.80 phút (Phương pháp 2); m/z 272/274 ($M+H$)⁺, (ES)⁺.

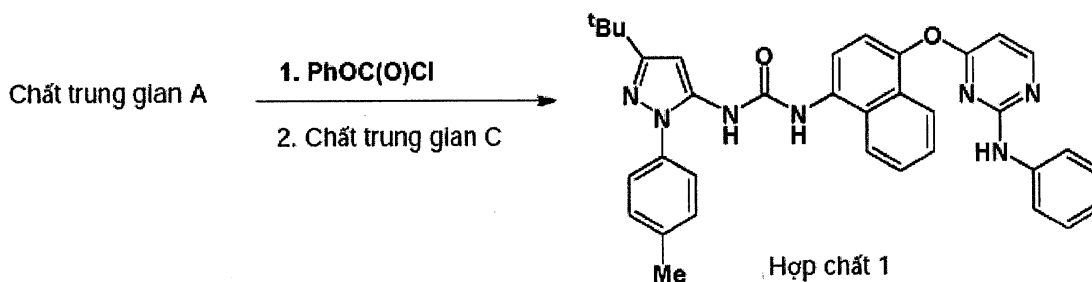
Cirillo, P. F. *et al.*, WO 2002/92576, 21 Nov 2000.

Chất trung gian C: 4-((4-Aminonaphthalen-1-yl)oxy)-*N*-phenylpyrimidin-2-amin.



Đối với dung dịch lọc nitơ của hỗn hợp Chất trung gian B (50,0g, 184mmol) và anilin (42,0mL, 460mmol) trong THF (200mL) được bổ sung *p*TSA (17,5g, 92,0mmol) trong một phần duy nhất. Hỗn hợp phản ứng được làm nóng đến 70°C trong 1,5 giờ trong khoảng thời gian kết tủa hình thành. Hỗn hợp được làm mát với nhiệt độ trong phòng và được pha loãng với THF (200mL). Chất kết tủa được gom lại bằng cách lọc, rửa với THF (2 x 100mL) và sau đó được tạo huyền phù ở hỗn hợp không đồng nhất của DCM (600mL) và aq. NaOH (2M, 200mL) và được khuấy mạnh trong thời gian 1 giờ, trong thời gian chất rắn lơ lửng được hòa tan. Các lớp được tách và lớp aq được chiết xuất với DCM (200mL). Chất chiết xuất DCM được kết hợp, làm khô và được bốc hơi trong chân không. Dư lượng đã được nghiền nhỏ với ete (150mL) và kết quả chất rắn được rửa với ete (2 x 50mL) để cho Chất trung gian C là chất rắn màu trắng nhò (26 g, 43%); nhiệt độ trong phòng 1,95 phút (Phương pháp 2); m/z 329 ($M+H$)⁺ (ES)⁺.

Hợp chất (I): 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(*p*-tolyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-((2-(phenylamino)pyrimidin-4-yl)oxy)naphtalen-1-yl)ure.



Hỗn hợp không đồng nhất của dung dịch Na_2CO_3 (3,84g, 36mmol) trong nước (42mL) và Chất trung gian A (10,5g, 45,7mmol) trong axetat isopropyl (130mL, 1,082mol) được khuấy mạnh với nhiệt độ trong phòng trong 5 phút và sau đó được điều trị với phenyl cacbonochloridat (5,77mL, 45,7mmol). Khuấy hỗn hợp được tiếp tục với thời gian hơn 4 giờ sau khi các lớp được tách. Pha hữu cơ được bổ sung vào dung dịch Chất trung gian C (10,0g, 30,5mmol) và triethylamin (423 μL , 3,05mmol) trong axetat isopropyl (60mL, 511mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm nóng đến nhiệt độ 48°C trong 1 giờ, sau đó được pha loãng với axetat isopropyl (190mL) và được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng với thời gian hơn 18 giờ, trong thời gian kết tủa hình thành. Sự kết tủa bị cô lập bằng cách lọc, được rửa với axetat isopropyl và sau đó được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C để cho tên Hợp chất, Hợp chất (1) là chất rắn màu trắng (bazơ tự do khan, dạng đa hình A) (16,5g, 92%); nhiệt độ trong phòng 2.74 phút (Phương pháp 2); m/z 584 ($\text{M}+\text{H}^+$) (ES^+); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1,30 (9H, s), 2,41 (3H, s), 6,43 (1H, s), 6,58 (1H, d), 6,78 (1H, t), 6,97 (2H, t), 7,28 (2H, br m), 7,39 (2H, d), 7,40 (1H, d), 7,49 (2H, d), 7,56 (1H, m), 7,63 (1H, m), 7,82 (1H, dd), 7,95 (1H, d), 8,10 (1H, d), 8,40 (1H, d), 8,77 (1H, s), 9,16 (1H, br s), 9,50 (1H, br s),

Ví dụ 2 - Tóm tắt kết quả sàng lọc trong ống nghiệm và trong cơ thể sống

Chất trong ống nghiệm của Hợp chất (I) được bộc lộ ở đây, như được xác định ở đây sử dụng protocol được mô tả ở trên, được thể hiện dưới đây (Bảng 4a đến 4f) so sánh với cấu trúc liên quan đến Hợp chất tham khảo là *N*-(4-(4-(3-(3-*tert*-butyl)-1-*p*-tolyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)ureido)naphtalen-1-yloxy)pyridin-2-yl)-2-metoxyacetamit, đã được mô tả trên đây là chất kháng tính dễ bị viêm hiệu nghiệm

với hoạt tính kháng virus (Ito, K. *et al.*, WO 2010/112936, PCT/GB2010/050575, 7 Oct 2010 và Ito, K. *et al.*, WO 2010/067130, PCT/GB2009/051702, 17 Jun 2010).

Hợp chất của sáng chế bộc lộ một dữ liệu ức chế rất giống với Hợp chất tham khảo trong phạm vi của các thử nghiệm enzym kinaza với ngoại lệ đáng kể của hoạt tính ức chế của Hợp chất (I) kháng enzym GSK3 α , rất yếu so với Hợp chất tham khảo (Bảng 4a).

Bảng 4a: Dữ liệu enzym p38 MAPK, c-Src, Syk và GSK3 α của Hợp chất (I)

Hợp chất thử nghiệm	Giá trị IC ₅₀ Values đối với chất ức chế enzym (nM)				
	p38 MAPK α	p38 MAPK γ	c-Src	Syk	GSK3 α
Hợp chất (I)	60	3739	22	334	>17000
Hợp chất tham khảo	12	344	5	42	45

Chất liên kết kinaza của Hợp chất (I) của sáng chế cũng được so sánh với Hợp chất tham khảo kháng p38 MAPK, HCK, cSrc, Syk, và GSK3 α/β . Hợp chất (I) thể hiện kiểu hình rất khác, thể hiện sự ức chế mạnh của chống liên kết các kinaza p38MAPK, HCK, cSrc và Syk, mà không ảnh hưởng đáng kể đối với GSK3 α (Bảng 4b).

Bảng 4b: So sánh Dữ liệu enzym liên kết của Hợp chất (I) với Hợp chất tham khảo.

Hợp chất thử nghiệm	Giá trị K _d đối với liên kết kinaza (nM)						
	p38 MAPK α	p38 MAPK γ	HCK	cSrc	Syk	GSK3 α	GSK3 β
Hợp chất (I)	20	43	8	10	14	20000	1200
Hợp chất tham khảo	1	5	5	4	9	180	24

Hợp chất của sáng chế chứng minh một chất tương tự với Hợp chất tham khảo trong các thử nghiệm tế bào bộc lộ các đặc tính kháng viêm chống lại sự giải phóng nội độc tố trung gian của TNF α và IL-8 (Bảng 4c). Các chất của các hợp chất cũng giống trong hệ thống tế bào đánh giá ảnh hưởng của chúng trên sự sao chép virus của đường hô hấp (HRV gây ra ICAM1 và CPE biểu hiện và RSV biểu hiện được kích thích của Protein F) cũng như viêm do virus gây ra (sự giải phóng khỏi kích HRV của IL-8; Bảng 4d).

Bảng 4c: Chất ức chế LPS gây ra TNF α và chất giải phóng IL-8 và Biểu hiện PolyIC gây ra ICAM cho Hợp chất (I)

Hợp chất thử nghiệm	Chất giải phóng LPS gây ra (nM)			PolyIC / ICAM1 (nM)
	TNF α		IL-8	
	IC ₅₀ (THP1)	REC ₅₀ (dU937)	IC ₅₀ (dU937)	IC ₅₀ (BEAS2B)
Hợp chất (I)	3,4	2,3	2,2	10,2
Hợp chất tham khảo	13	0,13	1,3	2,1

Bảng 4d: Ảnh hưởng của Hợp chất (I) với chất dẫn HRV-16 (CPE) và sự viêm (Biểu hiện của ICAM-1 và chất giải phóng IL-8 Release) và trên chất dẫn RSV (biểu hiện Protein F).

Chất thử	Giá trị IC ₅₀ (nM) đối với Chất giải phóng kích thích / biểu hiện HRV			Giá trị IC ₅₀ (nM) đối với Biểu hiện kích thích RSV
	IL-8	ICAM1	CPE	Protein F
	(BEAS2B)	(BEAS2B)	(MRC5)	(HBEC)

Hợp chất (I)	0,036	0,023	17,1	15,4
Hợp chất tham khảo	0,065	0,37	4,7	22,0

Hợp chất của sáng chế chứng minh tính hiệu quả cao hơn ở sản phẩm phân bào tiền viêm ở đại thực bào đờm và các tế bào biểu mô phế quản thu được từ các bệnh nhân bị COPD đã hầu như không nhạy cảm với fluticason propionat, cocticosteroid, (Bảng 4e).

Bảng 4e: Kết quả của Hợp chất (I) và Fluticason propionat ở chất giải phóng phân bào tiền viêm ở các đại thực bào đờm và tế bào biểu mô phế quản ở các bệnh nhân bị COPD.

		Giá trị IC ₅₀ (nM) và /hoặc E max (% trong ngoặc đơn) ¹ đối với chất thử nghiệm chỉ định	
Kiểu tế bào	Xytokin	Hợp chất (I)	Fluticason Propionat
Đại thực bào đờm	IL-6	43 (79)	(26)
	IL-8	68 (64)	(19)
	TNF α	17 (86)	(18)
	MIP1 α	7,5 (89)	(20)
Tế bào biểu mô phế quản	IL-6	1,7 (100)	(38)
	IL-8	0,85 (100)	(17)

1. Giá trị E-max (ức chế tối đa) đã được tính là % ức chế thu được 0.1 μ g/mL

Tuy nhiên, thuận lợi là, Hợp chất (I) cho thấy hoạt tính không rõ rệt trong hệ thống thử nghiệm mà đánh giá ảnh hưởng của nó ở khả năng sống của tế bào và sự phân chia tế bào (sự phân bào) chỉ định rằng Hợp chất có khả năng tiến hành chỉ số điều trị cao trên Hợp chất tham khảo (Bảng 4f).

Bảng 4f: Kết quả của Hợp chất (I) trên khả năng sống của tế bào và sự phân chia tế bào

Chất thử	Thử nghiệm MTT ¹		Thử nghiệm phân bào
	Khả năng sống của tế bào ở thời điểm được chỉ định ở tế bào d-U937		% ức chế ở 5µg/mL trong tế bào PBMC
	4h	24h	
Hợp chất (I)	-ve	-ve	31,3
Hợp chất tham khảo	-ve	+ve	87,8

1. Khả năng sống của lưới tế bào: -ve và +ve chỉ rõ giá trị là thấp và ở trên tương ứng, ngưỡng ảnh hưởng không đáng kể xác định 30% chất ức chế ở 1µg/mL ở thời điểm đã định.

Quá trình điều trị của chuột với Hợp chất (I) được thấy sản sinh ra liều ức chế phụ thuộc trên sự tích lũy bạch cầu trung tính gây ra LPS và bộc lộ quãng thời gian thử nghiệm mà thuốc có thời gian tác dụng dài (Bảng 5).

Bảng 5: Kết quả điều trị với Hợp chất (I) trên sự tăng bạch cầu trung tính ở đường khí đạo gây ra LPS ở chuột.

Hợp chất (I) (mg/mL)	Số lượng tế bào trung tính ở BALF (x10 ⁵ /mL)		
	Trước thời gian chỉ định liều (% chất ức chế) ¹		
	2 giờ	8 giờ	12 giờ
Vật dẫn	18,9 ± 2,5	-	-
0,05	15,6 ± 2,1 (18)	-	-
0,2	9,8 ± 1,6 (48)	-	-

1,0 $4,4 \pm 0,89$ (77) $9,9 \pm 1,8$ (48) $18,3 \pm 2,3$ (4)

1. N = 8 mỗi nhóm

Kết quả điều trị với Hợp chất (I) ở đại thực bào và sự tích lũy bạch cầu trung tính ở BALF trong mô hình chuột hít khói thuốc lá đã được nghiên cứu (Bảng 6a). Mô hình khói thuốc lá được sử dụng cho nghiên cứu này được ghi nhận cho hệ thống kháng cocticosteroid, (Medicherla S. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, 324(3):921-9.) và nó được xác nhận rằng fluticason propionat không hạn chế hoặc sự tích tụ bạch cầu trung tính hoặc đại thực bào trong đường khí đạo ở $1.75\mu\text{g}/1$ con chuột ($35\mu\text{L}$, bid, i.n.), liều lượng tương tự sản xuất $>80\%$ chất ức chế của sự tích lũy bạch cầu trung tính gây ra LPS.

Quá trình điều trị ở chuột với Hợp chất (I) cho thấy để sản xuất ức chế phụ thuộc liều ở cả sự tích lũy đại thực bào và bạch cầu trung tính ở BALF gây ra bởi khói thuốc lá.

Bảng 6a: Kết quả điều trị với Hợp chất (I) với khói thuốc lá ở chuột.

Hợp chất điều trị (I) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Lượng tế bào ở BALF x $10^4/\text{mL}$ (% ức chế)	
	Đại thực bào	Bạch cầu trung tính
Vật dẫn + không khí	$4,3 \pm 0,45$	$2,6 \pm 0,21$
Vật dẫn + khói thuốc lá	$14,4 \pm 0,33$	$13,7 \pm 0,31$
0,32	$13,3 \pm 0,20$ (11)	$12,4 \pm 0,32$ (12)
1,6	$11,6 \pm 0,42$ (28)	$10,5 \pm 0,06$ (29)
8,0	$10,1 \pm 0,42$ (43)	$9,1 \pm 0,28$ (41)
40	$7,9 \pm 0,20$ (64)	$7,9 \pm 0,34$ (52)

Dữ liệu lượng tế bào được thể hiện là $\pm$ SEM, N=5

Sự điều trị ở chuột với Hợp chất (I) cũng hạn chế khói thuốc lá gây ra sản phẩm CXCL1 (KC) ở BALF ở trạng thái phụ thuộc liều (Bảng 6b).

Bảng 6b: Kết quả điều trị với Hợp chất (I) trên sự giải phóng CXCL1 (KC) ở BALF với khói thuốc lá ở chuột.

Hợp chất điều trị (I) ($\mu\text{g/mL}$)	CXCL1 ở BALF pg/mL (% ức chế)
Vật dẫn + không khí	$8,2 \pm 0,30$
Vật dẫn + khói thuốc lá	$13,6 \pm 1,69$
0,32	$13,6 \pm 1,69$ (0)
1,6	$12,2 \pm 0,96$ (26)
8,0	$11,4 \pm 0,15$ (41)
40	$9,5 \pm 0,84$ (76)

Dữ liệu với mức độ CXCL được biểu hiện là $\pm$ SEM, N=5

Tóm lại, các kết quả này gợi ý rằng Hợp chất (I) có các đặc tính kháng viêm giống như ở Hợp chất tham khảo được bộc lộ ở trên và, tính thuận lợi, được kết hợp với chỉ số điều trị cao.

Ví dụ 3: điều chế của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B

Hợp chất (I) (398 g, ở dạng đa hình A) được đưa lên ở axeton (3,98 L) và dung dịch được làm nóng đến 50°C . NORIT A SUPRA (19.9g, hoạt hóa cacbon) và diatomit, chất trợ dung (3,98g; chất lọc) sau đó được bổ sung và hỗn hợp được làm nóng chảy (56°C) trong 15 phút. Hỗn hợp được lọc và chất rắn thu được được rửa với axeton (100mL). Lọc kết hợp và axeto rửa được làm tan chảy (56°C), và 900mL dung môi bị loại bằng quá trình chưng cất dưới áp suất khí quyển là 56°C . Hỗn hợp được làm mát tới nhiệt độ 50°C và nước (398mL) sau đó được bổ sung trong thời gian 1 giờ với nhiệt độ được duy trì là 50°C . Sau khi bổ sung 30 phút ở nhiệt độ 50°C hỗn hợp không đồng nhất được làm mát ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 6 giờ và sau đó được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 10 giờ. Sản phẩm thu được được đem đi lọc và phần đông bánh được rửa với axeton (318mL). Sản phẩm được

làm khô trong chân không ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 20 giờ để bào chế Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B (240,9 g; hiệu suất 60,5%).

Theo phương pháp có thể chọn được chấp nhận để tạo điều kiện kết tinh hạt.

Ví dụ 3a: điều chế Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B chứa dung môi dư gây ra

Tùy chọn, Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, như được bào chế theo quy trình được mô tả ở trên (Ví dụ 3) hoặc phương pháp tương tự, có thể được pha loãng lại vào nước để làm giảm dung môi dư như nêu dưới đây:

Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B (230g, như được bào chế theo Ví dụ 3) được tạo huyền phù trong nước được khử ion hóa (2,30L) và được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 4 giờ. Hỗn hợp được lọc và sản phẩm được rửa với nước được khử ion hóa (2 x 115mL) và sau đó được làm khô ở nhiệt độ 45°C trong chân không để bào chế Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B chứa dung môi dư giảm (227 g, 98,7%).

Ví dụ 4: micro hóa của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B

Tinh thể đa hình micro hóa dạng B của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan được bào chế có sử dụng thiết bị micro hóa nghiền phản lực (1,5 thanh sử dụng chất dẫn nạp với áp lực phun của thanh 1,5) (được sản xuất bởi Hosokawa Alpine). Sự phân bố kích thước hạt được đánh giá có sử dụng nhiều xạ tia laze (dụng cụ Malvern Mastersizer 2000S). Sự phân bố cỡ hạt có thể được diễn tả sử dụng giá trị D_{10} , D_{50} và D_{90} . Giá trị giữa D_{50} của sự phân bố kích thước hạt được định nghĩa là kích thước hạt theo micromet được chia theo phân nửa. Sự đánh giá lấy từ nhiều xạ tia laze được mô tả chính xác nhiều là sự phân chia khối lượng, và do vậy giá trị D_{50} thu được có sử dụng quy trình này được đề cập có ý nghĩa hơn giá trị Dv_{50} (điểm giữa cho sự phân chia khối lượng). Như được sử dụng ở đây giá trị Dv liên quan đến sự phân bố kích thước hạt được đánh giá có nhiều xạ tia laze. Tương tự, các giá trị D_{10} và D_{90} , được sử dụng trong phạm vi bị nhiễu xạ tia laze, được lấy để có giá trị Dv_{10} và Dv_{90} và liên quan đến kích thước hạt theo đó 10% của sự phân chia nằm dưới giá trị D_{10} , và 90% của dưới giá trị D_{90} , tương ứng. Tinh thể đa hình micro hóa dạng B của Hợp

chất (I) là bazơ tự do khan có sự phân chia kích thước hạt như sau: 0,850 μ m D₁₀; 1,941 μ m D₅₀ và 4,563 μ m D₉₀.

Ví dụ 5: phân tích XRPD của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A và B

Phân tích XRPD của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn A và B (đa hình dạng B được micro hóa theo quy trình của Ví dụ 4) được thực hiện sử dụng phương pháp được mô tả trong Các quy trình chung. Các mô hình nhiễu xạ thu được được thể hiện ở Fig.1 và Fig.2 tương ứng. Hai mẫu XRPDs cho thấy các đỉnh nhiễu xạ mà không xuất hiện halo, do vậy chỉ ra rằng các nguyên liệu là sự kết tinh. Các đỉnh và cường độ của chúng được liệt kê dưới đây (Bảng 7a và Bảng 7b).

Bảng 7a: các đỉnh khác biệt XRPD và cường độ của chúng với Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở thể rắn, tinh thể, dạng A

Các đỉnh XRPD

Giá trị 2-Teta ¹	Cường độ
7,8	19,7
8,7	20,8
10,3	22,6
11,2	23,1
12,4	24,6
15,2	25,5
16,2	26,7
17,5	27,4

1, Giá trị là $\pm 0,2$ độ

Bảng 7b: các đỉnh khác biệt XRPD với Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn B, sau micro hóa.

Đỉnh XRPD	
Giá trị 2-Teta ¹	Cường độ
3,9	16,7
6,1	18,3
7,7	18,7
8,6	19,9
10,9	20,9
11,8	22,0
12,7	22,6
14,3	25,2
15,9	28,9
1, giá trị là $\pm 0,2$ độ	

Ví dụ 6: xác định điểm chảy của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn A và B

Các điểm chảy của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn A và B (micro hóa sau cùng) thu được có sử dụng phép phân tích nhiệt quét vi sai (DSC), như được mô tả ở Quy trình chung. dạng đa hình A tan chảy ở nhiệt độ 191,6°C và dạng đa hình B tan chảy ở nhiệt độ 214,0°C. Từ dữ liệu DSC, tính được rằng dạng B có nhiệt dung cao hơn dạng A. Từ dạng B cũng có điểm chảy cao hơn dạng A, nó chỉ ra rằng đa hình dạng A và B có liên quan đến đơn hướng, có nghĩa là điểm chảy đa hình dạng B cao hơn sẽ ổn định hơn điểm chảy đa hình dạng A thấp

hơn, ở tất cả trạng thái nhiệt độ. Như vậy, có thể hy vọng rằng đa hình dạng B ổn định nhiệt động lực học hơn đa hình dạng A.

Ví dụ 7: Phân tích nhiệt của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, sau micro hóa.

Phân tích nhiệt của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở tinh thể đa hình dạng B (được micro hóa) được cam kết sử dụng các phân tích TGA, DVS, XRPD, IR phổ học và DSC như được mô tả ở Quy trình chung. Ở nơi thích hợp, mẫu ở nhiệt độ môi trường và độ ẩm tương đối (mẫu tham khảo/ “0 ngày”) được so sánh với các mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ khác nhau và độ ẩm tương đối (các mẫu so sánh).

Phân tích nhiệt trọng lượng: Mẫu tham khảo ($t = 0$) và các mẫu so sánh mà được bọc lộn trong các phân tích ở các điều kiện lưu giữ khác nhau, được gia nhiệt theo tốc độ $20^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ nhiệt độ trong phòng đến 300°C . Đường cong TGA của mẫu tham khảo ($t = 0$) được minh họa ở Fig.3 và kết quả của tất cả các mẫu được tóm tắt dưới đây (Bảng 8). Như đã nhìn thấy từ Fig.3, giảm 0,6% trọng lượng được quan sát ở phạm vi nhiệt độ từ nhiệt độ trong phòng đến 180°C , đó là do sự bay hơi của dung môi. Giảm trọng lượng xuất hiện ở trên nhiệt độ 180°C do sự bay hơi và sự phân hủy của sản phẩm. So sánh dữ liệu giảm trọng lượng này với các dữ liệu khác của các mẫu so sánh trong Bảng 8, không có khác biệt đáng kể nào được quan sát thấy.

Sự hấp thụ hơi bằng lực động: Sơ đồ đẳng nhiệt DVS với mẫu tham khảo được micro hóa được minh họa ở Fig.4 và sự thay đổi DVS ở sơ đồ khối với mẫu tham khảo được micro hóa được minh họa ở Fig.5. Trong bước làm khô ban đầu, không bị mất trọng lượng được đăng ký và sản phẩm cho thấy không tiến hành hút ẩm. Sản phẩm được thấm hút 0,4% độ ẩm tùy theo độ ẩm không khí. Sản phẩm được thấy làm khô hoàn toàn và được giữ ở tình trạng tinh thể rắn tương tự (Dạng B) trong thử nghiệm, như đã được chứng minh bằng quang phổ IR và mẫu XRPD hoàn toàn giống như trước và sau phân tích DVS.

Phân tích XRPD và nghiên cứu phổ học IR: hình ảnh nhiễu xạ XRPD của mẫu tham khảo ($t = 0$) được minh họa ở Fig.2 và vết IR được minh họa ở Fig.6. Hình ảnh nhiễu xạ và vết IR được so sánh với các hình ảnh và vết của các mẫu so sánh

(tiếp xúc với điều kiện lưu giữ khác nhau) và kết quả được tóm tắt ở Bảng 8. Hình ảnh nhiễu xạ và các vết IR là giống hệt với tất cả các mẫu.

Phân tích nhiệt quét vi sai: Mẫu tham khảo ($t = 0$) và các mẫu so sánh, được bọc lộn trên đây ở điều kiện lưu giữ khác nhau, được gia nhiệt ở tốc độ $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ từ nhiệt độ 25°C đến 300°C . Đường cong DSC của mẫu tham khảo được minh họa ở Fig.7 và kết quả cho tất cả các mẫu được tóm tắt dưới đây (Bảng 8). Từ Fig.7, được chứng minh rằng mẫu tham khảo tan chảy cùng với sự phân hủy ở nhiệt độ $214,0^{\circ}\text{C}$.

Bảng 8: Phân tích nhiệt của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B sau micro hóa.

Điều kiện để lưu giữ	TGA		XRD ^{1,2}	IR	DSC ³	Biểu hiện
	<100°C	<180°C				
T = không		0,6	Cryst, Ref	Cryst, Ref	214	màu trắng nhờ
1 tuần / 80°C	NT	NT	~Ref	~Ref	NT	màu trắng nhờ
1 tuần / 70°C / 75% RH	NT	NT	~Ref	~Ref	NT	màu trắng nhờ
4 tuần / nhiệt độ trong phòng / <5 % RH	0,8	0,5	~Ref	~Ref	214	màu trắng nhờ
4 tuần / nhiệt độ trong phòng / 56% RH	0,5	0,4	~Ref	~Ref	214	màu trắng nhờ
4 tuần / nhiệt độ trong phòng / 	0,9	0,5	~Ref	~Ref	214	màu trắng nhờ

75% RH						
4 tuần / 50°C	1,3	0,5	~Ref	~Ref	214	màu trắng nhờ
4 tuần / 40°C / 75% RH	0,8	0,3	~Ref	~Ref	214	màu trắng nhờ

1, Cryst,: tinh thể; 2,,~Ref: mô hình giống hệt nhau với mẫu tham khảo, 3, max (°C);
NT: không được thử với thử nghiệm này

Nói tóm lại, đã chứng minh rằng Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B có sự ổn định vật lý tốt.

Ví dụ 8: phân tích HPLC của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B sau micro hóa.

Sự ổn định hóa học của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, tiếp theo là micro hóa, được xác định bằng cách so sánh mẫu duy trì ở nhiệt độ môi trường và độ ẩm tương đối (mẫu tham khảo) với các mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ khác nhau và độ ẩm tương đối như đã được đề cập trên đây (các mẫu so sánh, Bảng 8). Các mẫu so sánh và tham khảo sau đó được phân tích bằng HPLC sử dụng phương pháp được mô tả trong Quy trình chung và qua kiểm tra trực quan. Kết quả từ nghiên cứu này (dữ liệu được tóm tắt ở Bảng 9) bộc lộ rằng Hợp chất (I), được bào chế là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B có sự ổn định hóa học mặc dù một số nhạy cảm với ánh sáng đã được quan sát thấy.

Bảng 9: Sự ổn định hóa học của Hợp chất (I) là bazơ tự do khan ở dạng đa hình, tinh thể, rắn B, sau micro hóa.

Điều kiện lưu giữ	Tổng lượng tạp chất bằng HPLC (%) ¹		Biểu hiện ¹	
	1 tuần	4 tuần	1 tuần	4 tuần

T = không	0,66	NT	màu nhờ	trắng	NT
0,3 day, ICH ánh sáng ²	1,44	NT	màu nhờ	trắng	NT
80°C	0,73	NT	màu nhờ	trắng	NT
70°C / 75% RH	0,73	NT	màu nhờ	trắng	NT
40°C / 75% RH	0,66	0,68	màu nhờ	trắng	màu nhờ
50°C	0,69	0,66	màu nhờ	trắng	màu nhờ
RT / <5% RH	NT	0,67	NT		màu nhờ
RT / 56% RH	NT	0,67	NT		màu nhờ
RT / 75% RH	NT	0,67	NT		màu nhờ

1. NT trong hệ thống thử nghiệm này; 2, ánh sáng ban ngày được kích thích: ánh sáng trong phòng 700 W/m²,

Ví dụ 9 – điều chế các dược phẩm

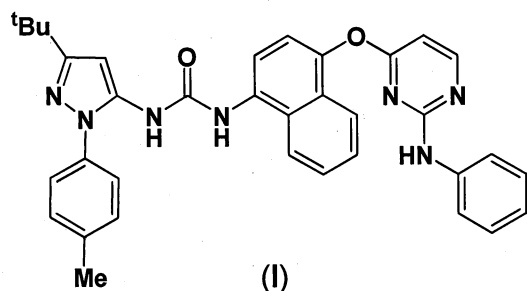
Dược phẩm mẫu của sáng chế bao gồm 0,4% trọng lượng ở Hợp chất (I) (là bazơ tự do khan ở dạng đa hình tinh thể rắn B), 98,6% lactoza hydrat đơn (cấp độ xông) và 1,0% stearat magiê, trong đó % trọng lượng của tất cả các thành phần dựa trên trọng lượng của dược phẩm khô.

Toàn bộ bản mô tả và yêu cầu bảo hộ được bộc lộ dưới đây, trừ khi phạm vi có yêu cầu khác, từ ngữ ‘bao gồm’, và sự khác biệt của nó chẳng hạn như ‘gồm’ và ‘bao gồm’, sẽ được hiểu là ngụ ý bao gồm toàn bộ, bước, nhóm của tổng thể hoặc nhóm của các bước nhưng không loại trừ bất kỳ tổng các bước, nhóm hoặc tổng nhóm của các bước.

Tất cả bằng và đơn được đề cập ở đây được kết hợp bằng tổng các tham chiếu của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I)



hoặc muối được dụng của chúng, bao gồm tất cả chất đồng phân lập thể và chất hỗ biến của chúng.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là bazơ tự do.

3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn.

4. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất có công thức (I) là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn có mẫu nhiễu xạ bột tia X cơ bản như được mô tả trong Fig. 1 (Dạng A).

5. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất có công thức (I) là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn có mẫu nhiễu xạ bột tia X chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc bảy các đỉnh được chọn từ ($\pm 0,2$) 10,3, 15,2, 17,5, 23,1, 24,6, 26,7 và 27,4 độ 2-teta.

6. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất có công thức (I) là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn có mẫu nhiễu xạ bột tia X cơ bản như được mô tả trong Fig. 2 (Dạng B).

7. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất có công thức (I) là bazơ tự do khan ở dạng tinh thể rắn có mẫu nhiễu xạ bột tia X chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tất cả tám các đỉnh được chọn từ ($\pm 0,2$) 3,9, 6,1, 11,8, 14,3, 16,7, 18,3, 18,7 và 28,9 độ 2-teta.

8. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, kết hợp với một hoặc nhiều dược chất pha loãng khả dụng hoặc các chất mang.

9. Sản phẩm kết hợp bao gồm:

(A) hợp chất có công thức (I) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 điểm 7; và

(B) chất điều trị khác;

trong đó mỗi thành phần (A) và (B) được bào chế trong hỗn hợp với chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng;

trong đó sản phẩm kết hợp này có thể là dược phẩm đơn hoặc kit chứa các phần.

FIG.1

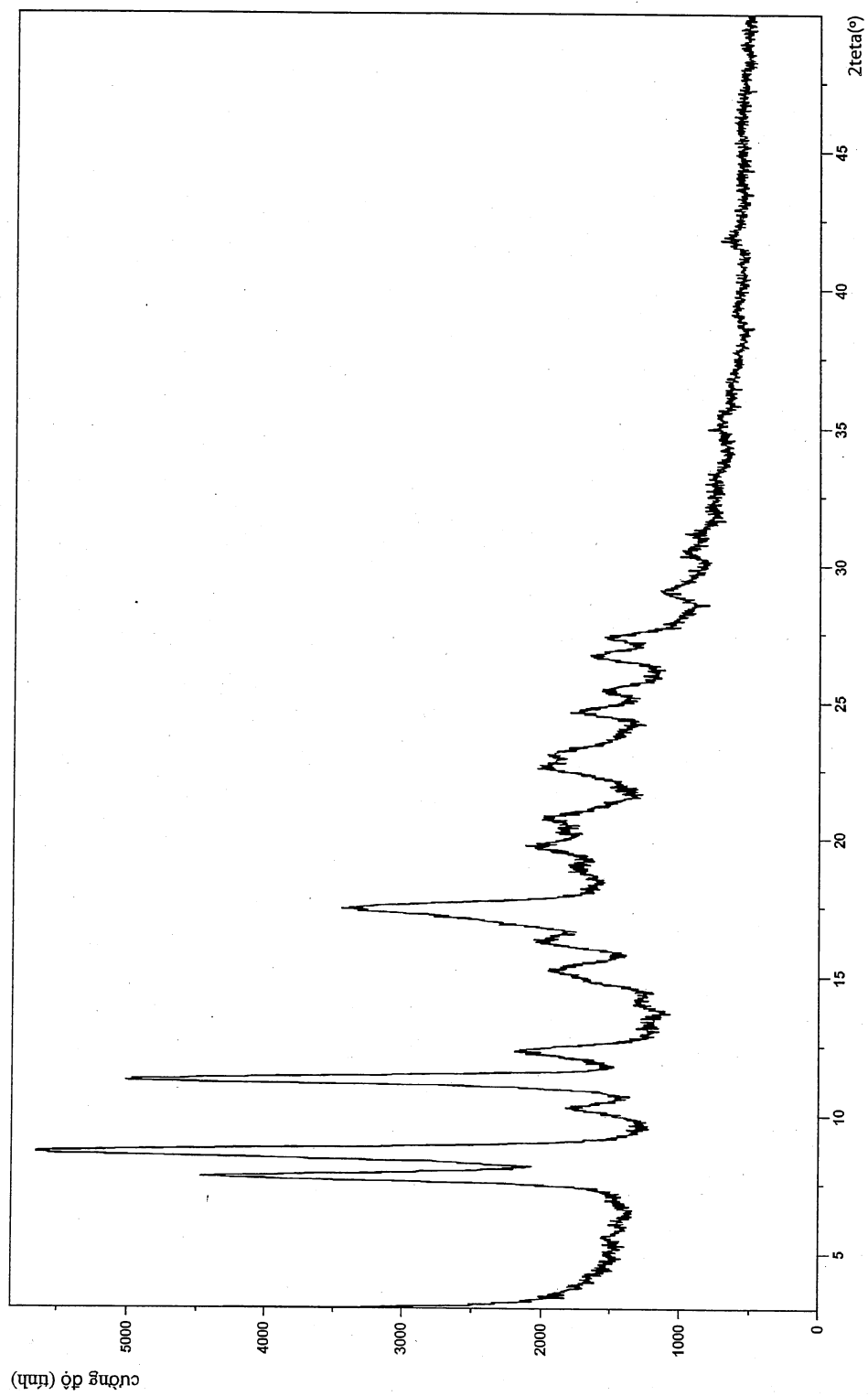


FIG.2

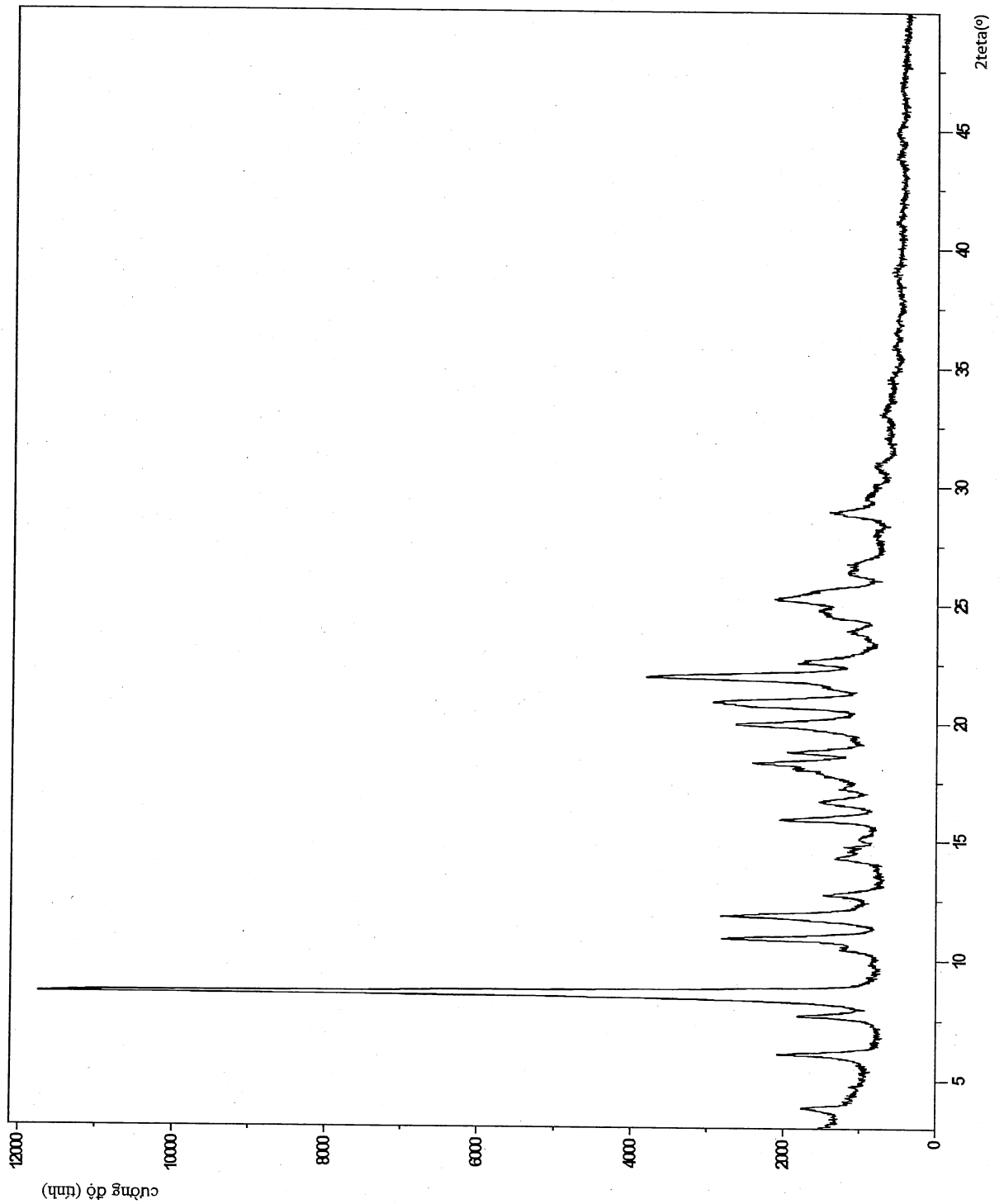


FIG.3

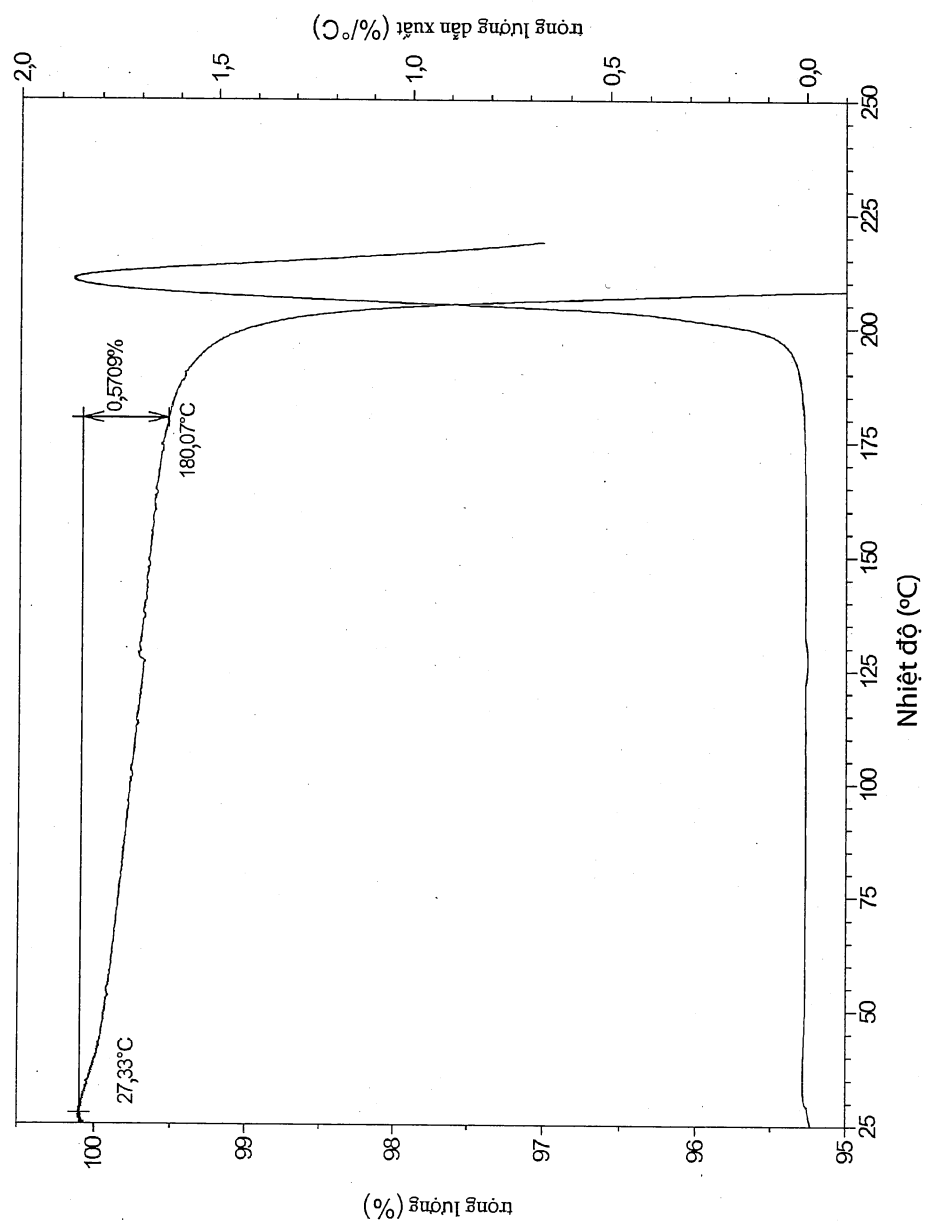


FIG.4

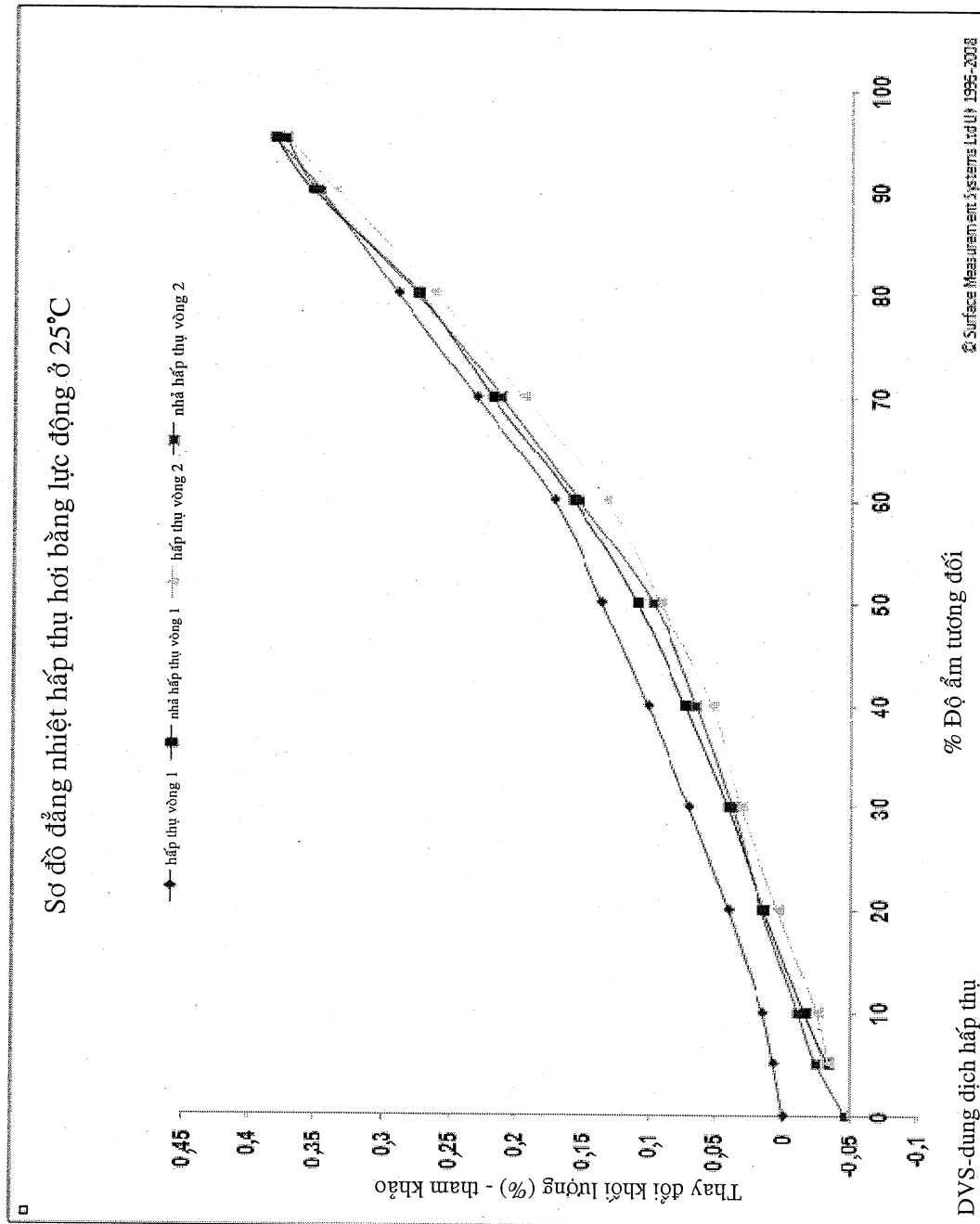


FIG.5

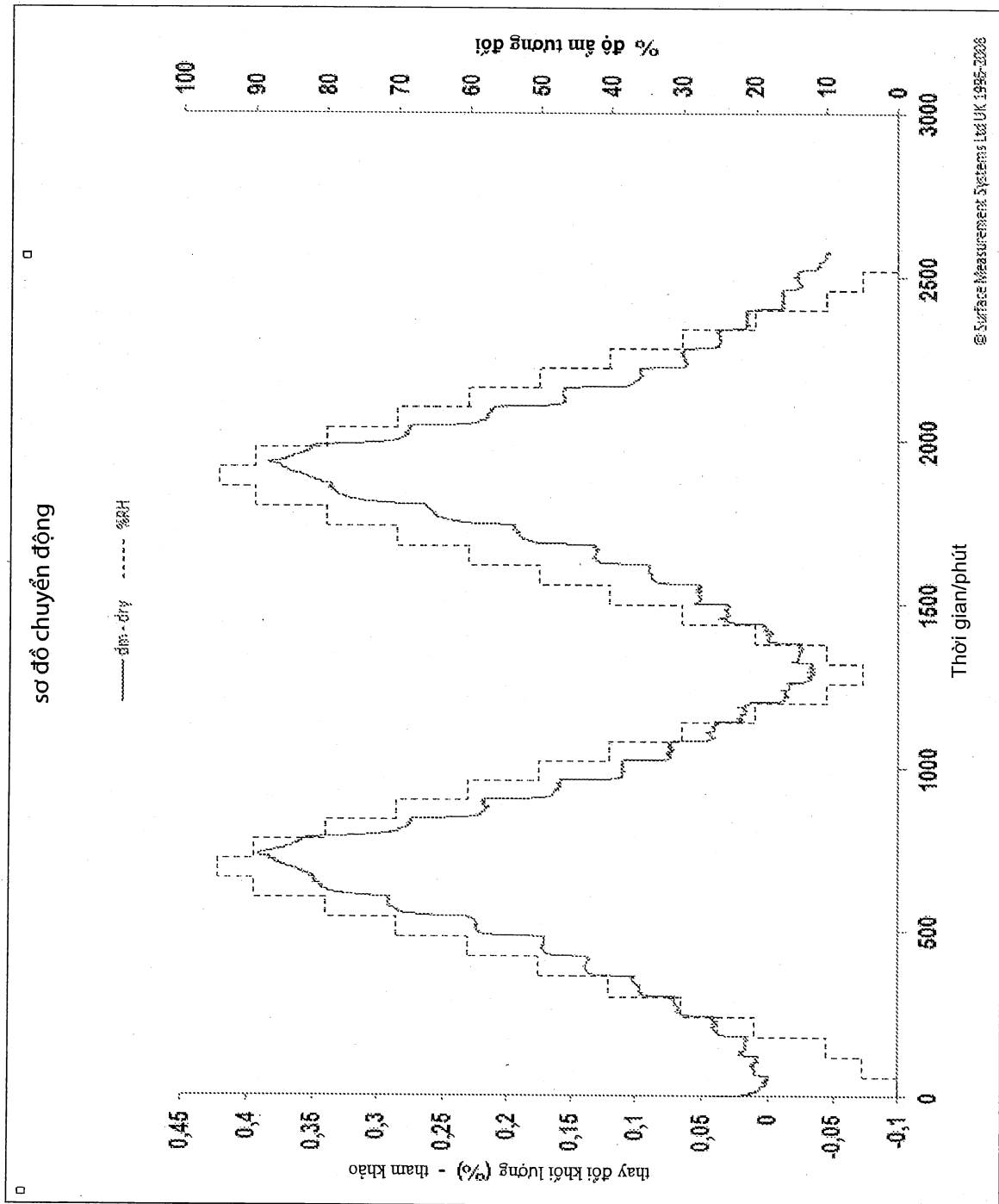


FIG.6

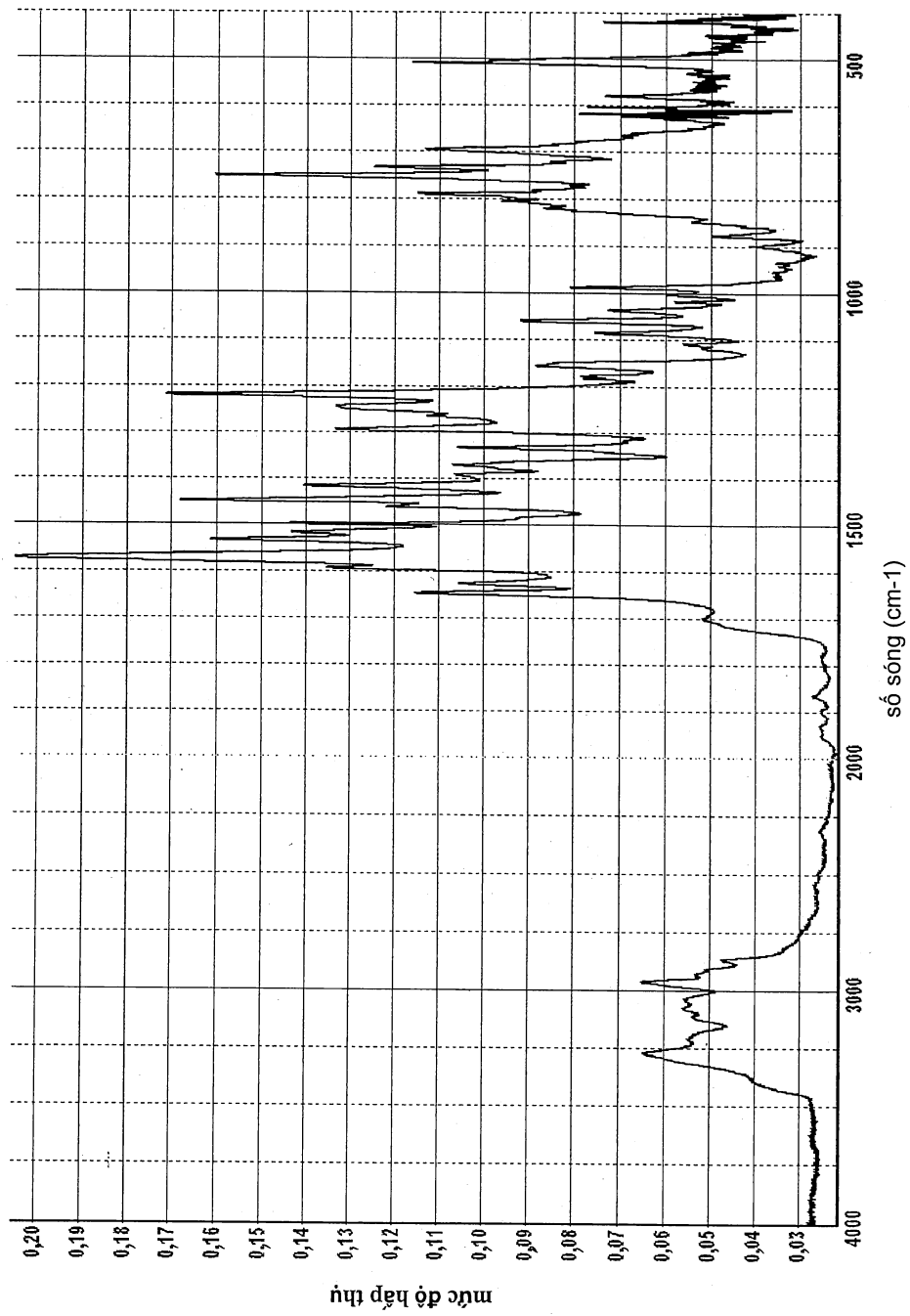


FIG.7

