



(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)



1-0030655

(51)⁷ C07D 401/12; C07D 253/07; A61K
31/53; A61P 31/12

(13) B

(21) 1-2015-01162

(22) 01/10/2013

(86) PCT/EP2013/070488 01/10/2013

(87) WO 2014/053516 10/04/2014

(30) 12306196.2 01/10/2012 EP

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/09/2015 330A

(73) 1. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (FR)

3, rue Michel Ange, F-75016 Paris, France

2. UNIVERSITE DE ROUEN (FR)

1 rue Thomas Beckett, F-76821 Mont Saint Aignan Cedex, France

3. INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE ROUEN (INSA)
(FR)

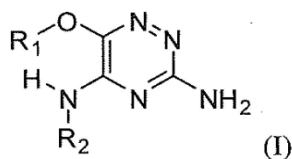
Avenue de l'Université, F-76801 Saint Etienne Du Rouvray, France

(72) GEMBUS Vincent (FR); JUBAULT Philippe (FR); HOARAU Christophe (FR);
LEVACHER Vincent (FR); BONFANTI Jean-François (FR); MC GOWAN David
Graig (BE); GUILLEMONT Jérôme Emile Georges (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẤT DẪN XUẤT 1,2,4-TRIAZIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ ĐỂ ĐIỀU TRỊ
BỆNH NHIỄM VIRUT

(57) Sáng chế đề cập đến chất dẫn xuất 1,2,4-triazin, quy trình điều chế chất dẫn xuất này,
dược phẩm chứa chất dẫn xuất này để điều trị bệnh nhiễm virut.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất dẫn xuất 1,2,4-triazin, quy trình điều chế chất dẫn xuất này, dược phẩm chứa chất dẫn xuất này để điều trị bệnh nhiễm virut.

Sáng chế đề cập đến chất dẫn xuất 1,2,4-triazin dùng để điều trị bệnh nhiễm virut, các rối loạn miễn dịch hoặc viêm bằng cách điều biến, hoặc tác động chủ vận đối với thụ thể giống Toll (*Toll-like receptor*/TLR).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể giống Toll là protein xuyên màng chủ yếu được đặc trưng bởi miền giàu loxin ngoại bào và phần nhô vào bào tương chứa vùng bảo toàn. Hệ miễn dịch bẩm sinh có thể nhận biết các kiểu phân tử liên quan đến tác nhân gây bệnh thông qua TLR biểu hiện trên bề mặt tế bào của một số loại tế bào miễn dịch. Sự nhận biết tác nhân gây bệnh ngoại lai sẽ hoạt hóa quá trình sản xuất xytokin và quá trình điều hòa tăng của các phân tử đồng kích thích trên thể thực bào. Điều này dẫn đến việc điều biến hoạt động của tế bào T.

Người ta ước tính rằng hầu hết các loài động vật có vú có từ mười đến mười lăm loại thụ thể giống Toll. Mười ba loại TLR (từ TLR1 đến TLR13) đã được xác định ở người và ở chuột, và các dạng tương đương của nhiều loại TLR trong số này đã được tìm thấy ở các loài động vật có vú khác. Tuy nhiên, các dạng tương đương của một số TLR nhất định ở người lại không có ở tất cả các loài động vật có vú khác. Ví dụ, gen mã hoá protein tương tự TLR10 ở người có ở chuột, nhưng dường như đã bị phá hỏng ở một thời điểm trong quá khứ bởi retrovirut. Mặt khác, các con chuột biểu hiện TLR11, TLR12, và TLR13, nhưng không một TLR nào trong số này có ở người. Các loài động vật có vú khác có thể biểu hiện TLR không tìm thấy ở người. Các loài động vật khác không phải là động vật có vú có thể có TLR khác với ở động vật có vú, như đã được chứng minh qua TLR14, được tìm thấy ở cá nóc Takifugu. Điều này có thể gây phức tạp cho quy trình sử dụng động vật thí nghiệm như quy trình thử nghiệm miễn dịch bẩm sinh ở người.

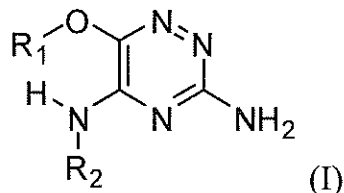
Để biết về TLR, có thể xem các bài báo sau. Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, p33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., *Annual Rev. Immunology*, 21, p335-376, 2003; Ulevitch, R. J., *Nature Reviews: Immunology*, 4, p512-520, 2004.

Đã biết các hợp chất có hoạt tính trên thụ thể giống Toll, như dẫn xuất purin trong WO 2006/117670, dẫn xuất adenin được đề cập trong WO 98/01448 và WO 99/28321, và pyrimidin được đề cập trong WO 2009/067081.

Tuy nhiên, cần có các chất điều biến thụ thể giống Toll mới có tính chọn lọc ưu tiên, hiệu lực cao hơn, độ ổn định trao đổi chất cao hơn, và tính an toàn được cải thiện so với các hợp chất đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất có công thức (I)



hoặc muối, chất hỗ biến, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó, trong đó:

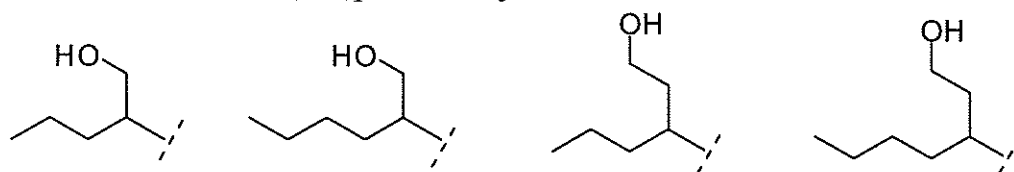
R_1 là C_{1-6} alkyl, arylalkyl, hoặc heteroarylalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C_{1-6} alkyl, di- (C_{1-6}) alkylamino, C_{1-6} alkylamino, C_{1-6} alkoxy, C_{3-6} xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, carboxylic amit, dị vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl, hoặc nitril.

R_2 là C_{1-8} alkyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkoxy, C_{3-6} xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, carboxylic amit, di- (C_{1-6}) alkylamino, C_{1-6} alkylamino, aryl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), trong đó R_2 là butyl hoặc pentyl và trong đó R_1 là như được xác định trên đây.

Theo phương án tiếp theo, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), trong đó R_2 là C_{1-8} alkyl được thế bằng hydroxyl, và trong đó R_1 là nhóm arylalkyl được thế hoặc không được thế.

Theo phương án tiếp theo, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), trong đó R_1 là arylalkyl và R_2 là C_{1-8} alkyl được thế bằng hydroxyl, hoặc một trong số các cấu hình hóa học lập thể bất kỳ sau:



Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức (I), trong đó R_1 là CH_3 và R_2 là như được xác định trên đây.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), trong đó R_1 là heteroarylalkyl, và R_2 là như được xác định trên đây.

Hợp chất có công thức (I) và muối, chất hỗ biến, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó có hoạt tính làm được phẩm, cụ thể làm các chất điều biến hoạt tính thụ thể giống Toll (đặc biệt là TLR7 và/hoặc TLR8).

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình của nó được dùng cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Ngoài ra, hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó có thể được dùng làm thuốc.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó, hoặc dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó có thể được sử dụng để điều trị rối loạn, trong đó quá trình điều biến TLR7 và /hoặc TLR8 được bao gồm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “alkyl” được dùng để chỉ hydrocacbon béo bão hoà mạch thẳng hoặc mạch nhánh có số nguyên tử cacbon đã nêu.

Thuật ngữ “halogen” được dùng để chỉ flo, clo, brom hoặc iot.

Thuật ngữ “alkenyl” được dùng để chỉ alkyl như được xác định trên đây chứa ít nhất hai nguyên tử cacbon và ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon.

Thuật ngữ “alkynyl” được dùng để chỉ alkyl như được xác định trên đây chứa ít nhất hai nguyên tử cacbon và ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon.

Thuật ngữ “xycloalkyl” được dùng để chỉ hệ vòng cacbon có số nguyên tử cacbon đã nêu.

Thuật ngữ “aryl” được dùng để chỉ cấu trúc nhân thơm tùy ý chứa một hoặc hai nguyên tử khác loại được chọn từ N, O và S, cụ thể từ N và O. Cấu trúc nhân thơm này có thể có 4, 5, 6 hoặc 7 nguyên tử trên vòng. Cụ thể, cấu trúc nhân thơm này có thể có 5 hoặc 6 nguyên tử trên vòng.

Thuật ngữ “heteroaryl” được dùng để chỉ cấu trúc nhân thơm như được xác định đối với thuật ngữ “aryl” chứa ít nhất 1 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O và S, cụ thể từ N và O.

Thuật ngữ “dị vòng có hai vòng” được dùng để chỉ cấu trúc nhân thơm, như được xác định đối với thuật ngữ “aryl” bao gồm hai vòng thơm ngưng tụ. Mỗi vòng này tùy ý chứa các nguyên tử khác loại được chọn từ N, O và S, cụ thể từ N và O.

Thuật ngữ “arylalkyl” được dùng để chỉ cấu trúc nhân thơm như được xác định đối với thuật ngữ “aryl” tùy ý được thế bằng nhóm alkyl.

Thuật ngữ “heteroarylalkyl” được dùng để chỉ cấu trúc nhân thơm như được xác định đối với thuật ngữ “heteroaryl” tùy ý được thế bằng nhóm alkyl.

Thuật ngữ “alkoxy” được dùng để chỉ nhóm alkyl (mạch chứa cacbon và hydro) liên kết với oxy, ví dụ như nhóm metoxy hoặc nhóm etoxy.

“Dị vòng” được dùng để chỉ các phân tử bão hoà hoặc bão hoà một phần và bao gồm etyloxit, tetrahydrofuran, đioxan hoặc các ete vòng khác. Dị vòng chứa nitơ bao gồm, ví dụ azetidín, morpholin, piperidín, piperazin, pyrrolidín, và các dị vòng tương tự. Các dị vòng khác bao gồm, ví dụ, thiomorpholin, dioxoliny, và sulfon vòng.

Các nhóm “heteroaryl” là các nhóm dị vòng thơm. Các nhóm này là vòng đơn, vòng đôi, hoặc đa vòng chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ N, O hoặc S. Nhóm heteroaryl có thể là, ví dụ, imidazolyl, isoxazolyl, furyl, oxazolyl, pyrrolyl, pyridonyl, pyridyl, pyridazinyl, hoặc pyrazinyl.

Các muối được dùng của hợp chất có công thức (I) bao gồm các muối cộng axit và bazơ của chúng. Các muối cộng axit thích hợp được tạo ra từ các axit tạo ra các muối không độc. Các muối bazơ thích hợp được tạo ra từ các bazơ tạo ra các muối không độc.

Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại dưới dạng không solvat hóa và solvat hóa. Thuật ngữ “solvat” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phức hợp phân tử bao gồm hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử dung môi được dùng, ví dụ, etanol.

Thuật ngữ “dạng đa hình” được dùng để chỉ khả năng của hợp chất theo sáng chế có thể có nhiều hơn một dạng hoặc nhiều hơn một cấu trúc tinh thể.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được cho dùng dưới dạng sản phẩm tinh thể hoặc vô định hình. Chúng có thể thu được, ví dụ dưới dạng hạt rắn, bột, hoặc màng bằng các phương pháp như kết tủa, kết tinh, sấy ở nhiệt độ thấp, sấy phun, hoặc làm khô bằng cách bay hơi. Chúng có thể được cho dùng dưới dạng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế khác hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Nói chung, chúng sẽ được cho dùng dưới dạng chế phẩm kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dùng. Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ thành phần bất kỳ mà không phải là hợp chất theo sáng chế. Việc lựa chọn các tá dược phụ thuộc phần lớn vào các yếu tố như kiểu đường dùng cụ thể, tác động của tá dược đến độ tan và độ ổn định, và bản chất của dược phẩm dạng liều.

Các hợp chất theo sáng chế hoặc phân nhóm bất kỳ của chúng có thể được bào chế thành các dạng dược phẩm khác nhau để dùng. Chế phẩm thích hợp có thể là tất cả các chế phẩm thường được sử dụng để dùng qua đường toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu hợp chất cụ thể, tùy ý cả dạng muối, dưới dạng thành phần hoạt tính được kết hợp trong hỗn hợp trộn kỹ với chất mang

được dùng, chất mang này có thể có nhiều dạng tùy thuộc vào dạng bào chế mong muốn để dùng.

Mong muốn là, các dược phẩm này ở dạng liều đơn vị thích hợp, ví dụ, để dùng qua đường miệng, trực tràng, hoặc dưới da. Ví dụ, để bào chế chế phẩm dưới dạng dùng qua đường miệng, các chất dẫn thuốc thường dùng bất kỳ có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và các chất dẫn thuốc tương tự trong trường hợp dược phẩm dạng lỏng dùng qua đường miệng như hỗn dịch, sirô, cồn ngọt, nhũ tương, và dung dịch; hoặc các chất mang rắn như tinh bột, đường, kaolanh, chất pha loãng, chất làm trơn, chất kết dính, các chất gây rã và các chất tương tự trong trường hợp dược phẩm dạng bột, viên tròn, viên nang, và viên nén. Vì dễ dùng, nên viên nén và viên nang là các dược phẩm dạng liều đơn vị có lợi nhất để qua đường miệng, trong trường hợp này các chất mang rắn được dùng được sử dụng. Cũng được bao gồm là các dược phẩm dạng rắn có thể được chuyển hóa không lâu trước khi sử dụng thành dạng lỏng. Trong các dược phẩm thích hợp để dùng qua da, chất mang tùy ý chứa chất tăng cường thẩm thấu và/hoặc chất thẩm ướt thích hợp, tùy ý kết hợp với các chất đệm thích hợp có đặc tính bất kỳ với tỷ lệ nhỏ, các chất đệm này không gây tác động có hại đáng kể cho da. Các chất đệm nêu trên có thể tạo thuận lợi cho việc cung cấp cho da và/hoặc có thể được sử dụng để bào chế các chế phẩm mong muốn. Các chế phẩm này có thể được dùng theo các cách khác nhau, ví dụ, dưới dạng cao dán da, dưới dạng chấm lên da, dưới dạng thuốc mỡ. Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng qua đường xông hít hoặc bơm vào bằng các phương pháp và các chế phẩm được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để dùng qua cách này. Do vậy, nói chung các hợp chất theo sáng chế có thể được đưa vào phổi dưới dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc bột khô.

Vì sự dễ dùng và độ đồng đều về liều lượng, đặc biệt có lợi nếu bào chế dược phẩm nêu trên dưới dạng liều đơn vị. Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng liều đơn vị được dùng để chỉ đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp dưới dạng liều đơn vị, mỗi đơn vị chứa lượng định trước thành phần hoạt tính được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết. Ví dụ về dạng liều đơn vị như vậy là viên nén (bao gồm viên nén có khía hoặc được bao), viên nang, viên tròn, gói thuốc bột, viên nhện, thuốc đạn, các dung dịch tiêm hoặc hỗn dịch và các dạng tương tự, và các phức hợp riêng biệt của chúng.

Các nhà chuyên môn trong điều trị bệnh truyền nhiễm sẽ có thể xác định được lượng hữu hiệu từ các kết quả thử nghiệm dưới đây. Nói chung, dự định rằng lượng hữu hiệu hằng ngày sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg thể trọng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg thể trọng. Có thể thích hợp nếu dùng liều cần thiết làm hai, ba, bốn liều nhỏ hoặc nhiều hơn cách nhau trong khoảng thời gian thích hợp trong ngày. Các liều nhỏ nêu trên có thể

được bào chế dưới dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa từ 1 đến 1000 mg, và cụ thể chứa từ 5 đến 200 mg thành phần hoạt tính trong mỗi dạng liều đơn vị.

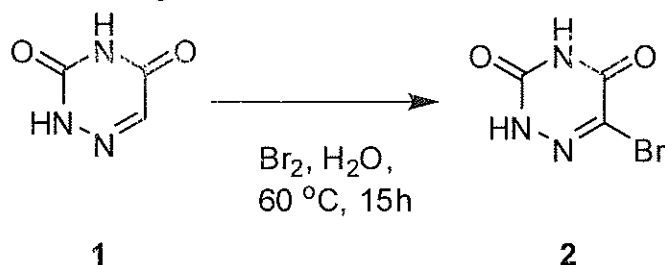
Liều lượng chính xác và tần suất dùng tùy thuộc vào hợp chất có công thức (I) cụ thể được sử dụng, tình trạng bệnh lý cụ thể đang được điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý đang được điều trị, tuổi tác, thể trọng và tình trạng thể chất nói chung của người bệnh cụ thể cũng như các dược phẩm khác mà người bệnh có thể dùng, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, đã thấy rằng lượng hữu hiệu có thể được giảm hoặc tăng tùy thuộc vào mức độ đáp ứng của người bệnh được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào sự đánh giá của bác sĩ kê đơn cho dùng các hợp chất theo sáng chế này. Do đó, khoảng lượng hữu hiệu nêu trên chỉ nhằm mục đích hướng dẫn mà không dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế hoặc sử dụng sáng chế ở mức độ bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Điều chế hợp chất có công thức (I)

Phân thử nghiệm.

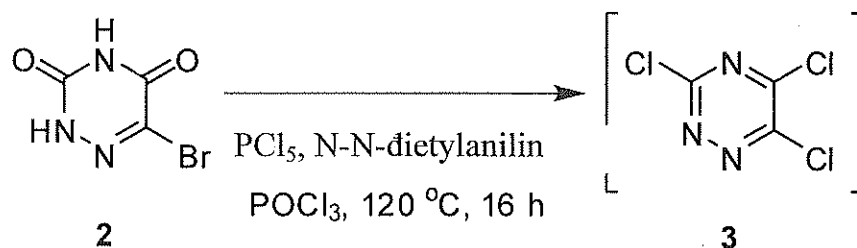
Điều chế hợp chất có công thức 2



Dung dịch chứa hợp chất có công thức 1 (20 g, 176,9mmol, 1 đương lượng) trong H₂O (320 mL) được bổ sung Br₂ (24 mL, 466,8mmol, 2,6 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 15 giờ, tiếp đó là bổ sung NH₄OH (50 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, HCl (dung dịch nước 6N) được bổ sung từ từ vào đến khi độ pH=5 và hỗn hợp này được chiết bằng ethyl axetat (3 x 800 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và nước muối, được làm khô (MgSO₄), các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi chứa phần dịch lọc được cô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất có công thức 2 (16 g).

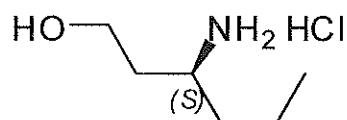
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δppm 12,56 (m, 1 H), 12,31 (m, 1H)

Điều chế hợp chất có công thức 3



Dung dịch chứa 2 (16 g, 83,3mmol) trong POCl_3 (80 mL) được bổ sung PCl_5 (36,1 g, 173,4mmol) và N, N-dietylanilin (35 mL, 221,7mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 5 giờ, sau đó dung môi dư được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn, hợp chất có công thức 3 (80 g), được sử dụng một cách trực tiếp ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Điều chế hợp chất có công thức 4

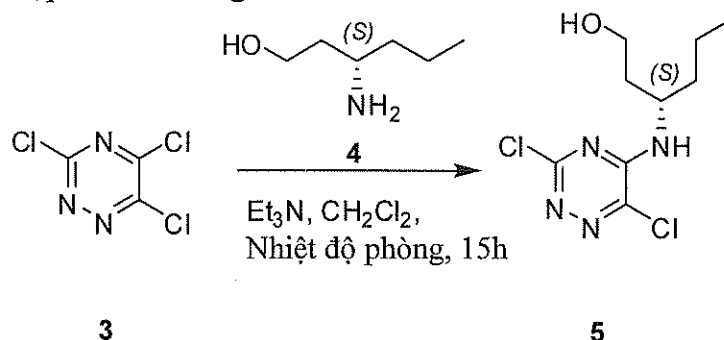


4

Hợp chất trung gian có công thức 4 được tổng hợp theo phương pháp điều chế hợp chất có công thức 9, bằng cách sử dụng butyraldehyt thay cho valeraldehyt.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ ppm 8,07 (s, 3H), 4,85 (br, 1H), 3,57-3,45 (m, 2H), 3,14-3,12 (m, 1H), 1,70-1,64 (m, 2H), 1,56-1,49 (m, 2H), 1,38-1,30 (m, 2H), 0,90-0,80 (t, $J=6,8\text{Hz}$, 3H).

Điều chế hợp chất có công thức 5

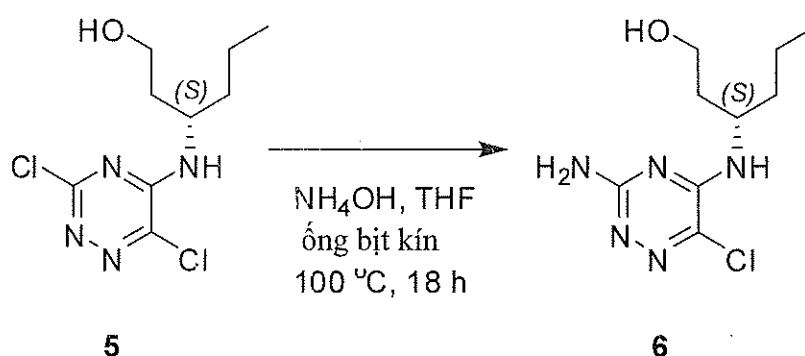


Dung dịch có khuấy chứa 3 (80 g thô, 82,8mmol) trong CH_2Cl_2 (300 mL) được bổ sung hợp chất có công thức 4 (12,8 g, 82,8mmol) và Et_3N (34,7 mL, 250mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được khuấy 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước (400 mL) và được

chiết bằng CH_2Cl_2 (3 x 500 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và nước muối, sau đó được làm khô (MgSO_4), các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi chứa phần dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel bằng cách sử dụng gradien từ ete dầu mỏ đến etyl axetat. Các phân đoạn tốt nhất được gộp lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được 5 (3g).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 6,85 (d, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 3,83 (m, 2 H), 2,0 (m, 1 H), 1,71 (m, 3 H), 1,38 (m, 2 H), 0,98 (t, 3H).

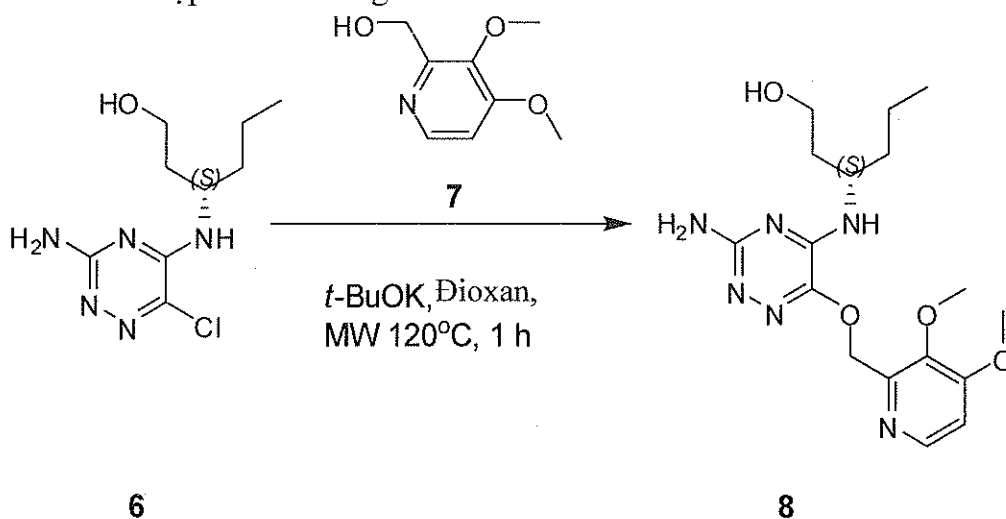
Điều chế hợp chất có công thức 6



Hợp chất có công thức 5 (3 g, 11,32mmol, 1 đương lượng) và NH_4OH (20 mL) trong THF (20 mL) được đặt trong ống bịt kín và được gia nhiệt đến 100°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi được làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước và được chiết bằng etyl axetat (3 x 50 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô (MgSO_4), các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi chứa phần dịch lọc được cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel sử dụng gradien từ CH_2Cl_2 đến $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$. Các phân đoạn tốt nhất được gộp lại và dung môi chứa phần dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được 6 (1,57g).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 5,65 (d, 1 H), 5,20 (brs, 2 H), 4,35 (m, 1 H), 3,65 (m, 2 H), 2,0 (m, 1 H), 1,60 (m, 3 H), 1,45 (m, 2 H), 0,93 (t, 3H).

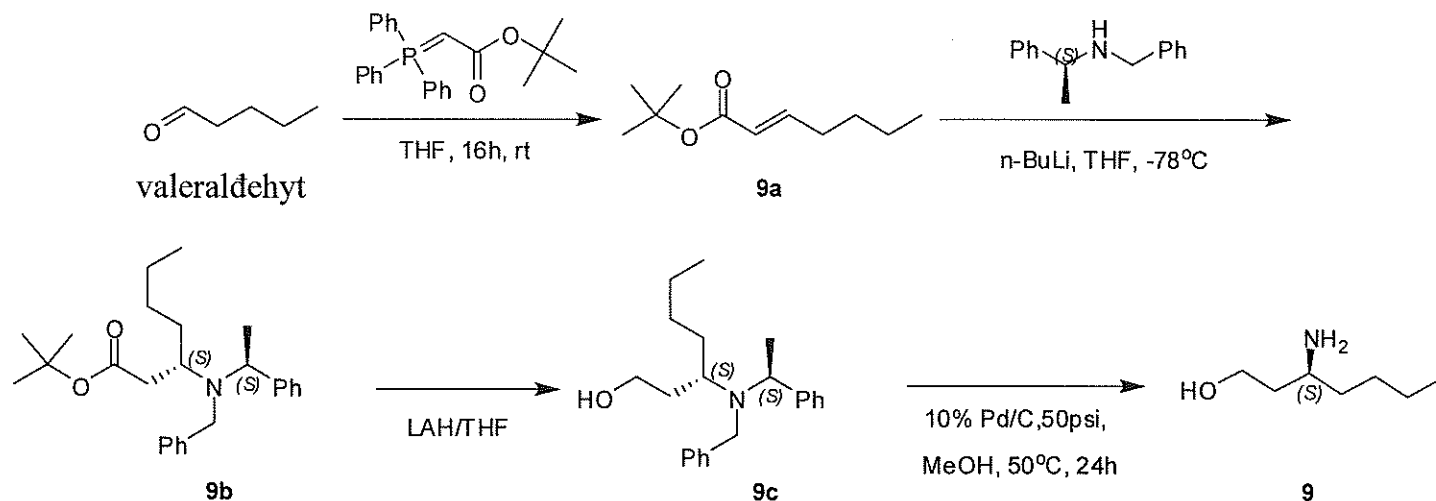
Điều chế hợp chất có công thức 8



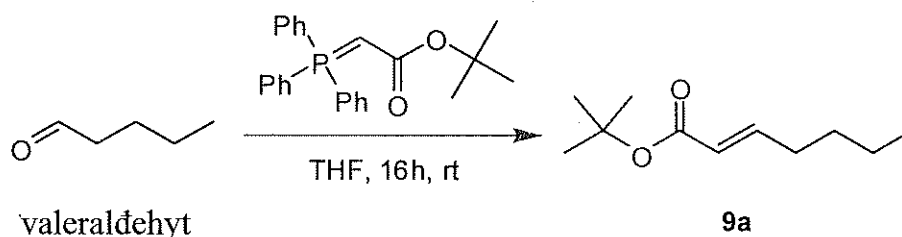
Hỗn hợp chứa 6 (1,2 g, 4,9mmol), 7 (4,13 g, 24,4mmol) và *t*-BuOK (1,6 g, 14,7mmol) trong dioxan (48 mL) được khuấy ở nhiệt độ 120°C trong lò vi sóng trong thời gian 1 giờ. Các chất rắn trong dung dịch được loại bỏ bằng cách lọc và phần dịch lọc được cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký lỏng tính năng cao điều chế (cột C18, sử dụng gradien từ nước (chứa dung dịch nước NH₃ 0,05% làm chất cải biến) đến axetonitril. Các phân đoạn mong muốn được gộp lại và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất có công thức 8 (100 mg).

¹H NMR (400 MHz, metanol-*d*₄): δppm 8,56 (d, 1 H), 7,73 (d, 1 H), 5,69 (s, 2 H), 4,54 (m, 1 H), 4,25 (s, 3 H), 4,06 (s, 3 H), 3,65 (m, 2 H), 1,75 (m, 4 H), 1,35 (m, 2 H), 0,94 (t, 3H).

Điều chế chung hợp chất có công thức 9



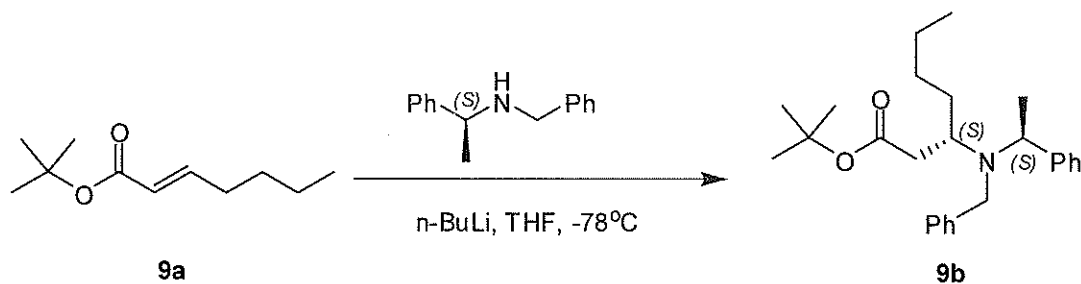
Điều chế hợp chất trung gian 9a



Dung dịch chứa valeraldehyt (43 g, 500mmol) trong THF (1 L) được bổ sung (tert-butoxycarbonylmetylen)triphenylphosphoran (200 g, 532mmol) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần cặn được pha loãng trong ete dầu mỏ và được lọc. Dung môi chứa phần dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng silica sắc ký trên silic oxit sử dụng ete dầu mỏ đến 3% etyl axetat trong ete dầu mỏ gradien để tạo ra hợp chất có công thức 9a (90 g) dưới dạng dầu không màu.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 6,81-6,77 (m, 1H), 5,68-5,64 (td, $J=1,2\text{Hz}$, 15,6 Hz, 1H), 2,11-2,09 (m, 2H), 1,406 (s, 9H), 1,38-1,26(m, 4H), 0,85-0,81(t, $J=7,2\text{Hz}$, 3H).

Điều chế hợp chất có công thức 9b

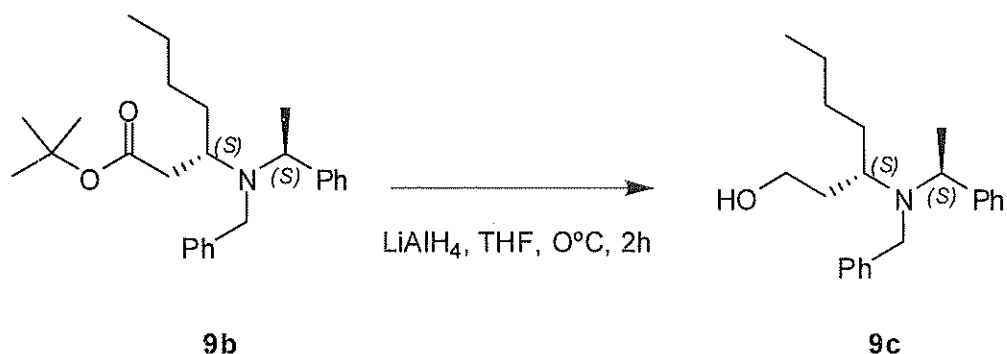


n-butyl lithi (290mL, 725mmol) được bổ sung vào dung dịch có khuấy chứa (S)-(-)-N-benzyl-1-phenyletylamin (165 g, 781mmol) trong THF (800 mL) ở nhiệt độ -78°C . Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 30 phút, sau đó hợp chất có công thức 9a (90 g, 488,4mmol) trong THF (400 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ -78°C . Hỗn hợp này được dập tắt phản ứng bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa và được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm được phân bố giữa etyl axetat và nước. Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô trên magie sulfat, các chất rắn được loại

bỏ bằng cách lọc, và dung môi chứa phần dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột rửa giải bằng 5% etyl axetat trong ete dầu mỏ để thu được dầu không màu, hợp chất có công thức 9b (132 g).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7,36-7,16 (m, 10H), 3,75-3,70 (m, 2H), 3,43-3,39 (d, $J=15,2\text{Hz}$, 1H), 3,33-3,15 (m, 1H), 1,86-1,80 (m, 2H), 1,47-1,37 (m, 2H), 1,32 (s, 9H), 1,26-1,17 (m, 7H), 0,83-0,79 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 3H).

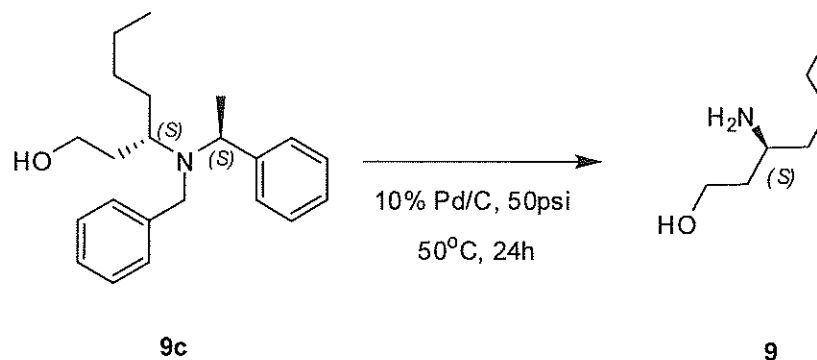
Điều chế hợp chất có công thức 9c



Hợp chất có công thức 9b (130 g, 328mmol) được hoà tan trong THF (1,5 L) và LiAlH_4 (20 g, 526mmol) được bổ sung ở nhiệt độ 0°C làm các phần nhỏ. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 2 giờ và sau đó được làm ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được dập tắt phản ứng bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa. Sản phẩm được phân bố giữa etyl axetat và nước. Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô và được làm bay hơi. Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat, các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được cô để thu được hợp chất thô có công thức 9c (100 g), hợp chất này được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7,33-7,14 (m, 10H), 3,91-3,86 (m, 1H), 3,80-3,77 (d, $J=13,6\text{Hz}$, 1H), 3,63-3,60 (d, $J=13,6\text{Hz}$, 1H), 3,43-3,42 (m, 1H), 3,15-3,10 (m, 1H), 2,70-2,63 (m, 2H), 1,65-1,28 (m, 10H), 0,89-0,81 (m, 3H).

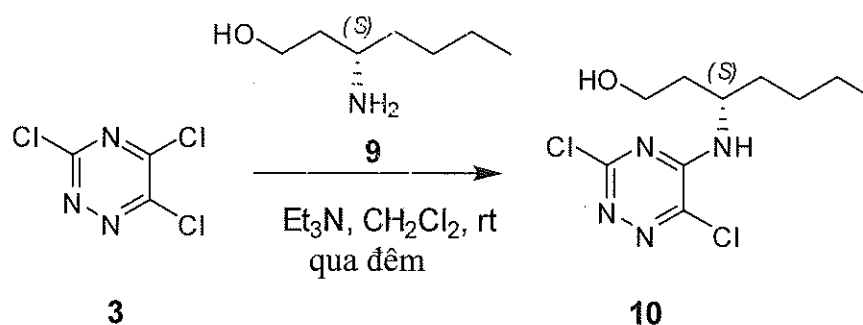
Điều chế hợp chất có công thức 9



Dung dịch chứa hợp chất có công thức 9c (38 g, 116,75mmol) và 10% Pd/C trong metanol (200 mL) được hydro hoá dưới áp suất của hydro bằng 50 psi ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc và dung môi được làm bay hơi để thu được hợp chất có công thức 9.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 8,04 (s, 3H), 3,60-3,49 (m, 2H), 3,16-3,15 (m, 1H), 1,71-1,67 (m, 2H), 1,60-1,55 (m, 2H), 1,33-1,26 (m, 4H), 0,90-0,87 (t, $J=6,8\text{Hz}$, 3H).

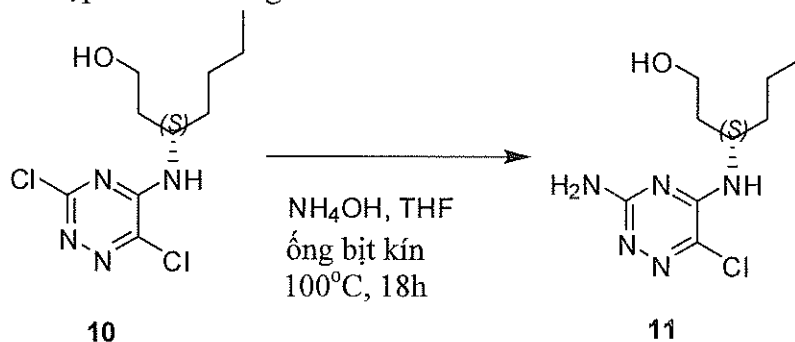
Điều chế hợp chất có công thức 10



Dung dịch có khuấy chứa hợp chất có công thức 3 (21,6g thô, 22,1mmol) trong CH_2Cl_2 (54 mL) được bổ sung hợp chất có công thức 9 (2,9 g, 22,1mmol) và Et_3N (9,2 ml, 66,3mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ này. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước (200 mL) và được chiết bằng CH_2Cl_2 (3 x 150 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và nước muối, được làm khô (MgSO_4), các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi chứa phần dịch lọc được cô dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel sử dụng gradient từ ete dầu mỏ đến ethyl axetat. Các phân đoạn tốt nhất được gộp lại, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được 10 (0,91 g).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6,71 (d, 1 H), 4,36 (m, 1 H), 3,83 (m, 2 H), 2,04 (m, 2 H), 1,70 (m, 2 H), 1,35 (m, 4 H), 0,92 (t, 3H)

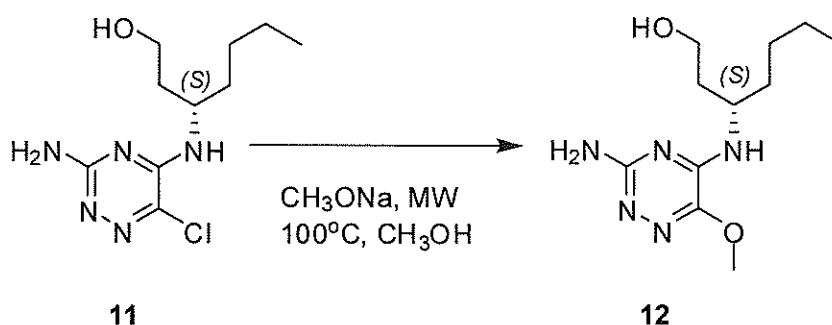
Điều chế hợp chất có công thức 11



Hợp chất có công thức 10 (0,91 g, 3,3mmol, 1 đương lượng) và amoni hydroxit (7 mL) trong THF (7 mL) được đặt trong ống bịt kín và được gia nhiệt đến 110°C trong thời gian 12 giờ. Sau khi được làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước và được chiết bằng etyl axetat (3 x 150 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô (MgSO_4), các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi chứa phần dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng trên silicagel điều chế sử dụng 10% metanol trong diclometan để thu được 170 mg hợp chất có công thức 11.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5,67 (d, 1 H), 5,29 (d, 2 H), 4,17 (m, 1 H), 3,66 (m, 2 H), 2,51 (brs, 1 H), 1,88 (m, 1 H), 1,55 (m, 3 H), 1,25 (m, 4 H), 0,83 (t, 3H).

Điều chế hợp chất có công thức 12



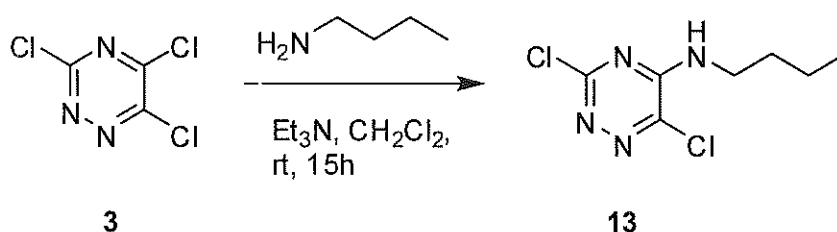
Hỗn hợp chứa 11 (170 mg, 0,64mmol) và natri metoxit (69 mg, 1,28mmol) trong CH_3OH (10 mL) được gia nhiệt đến 100°C trong lò vi sóng cùng với khuấy trong thời gian 1 giờ. Các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và phần dịch lọc

được cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký lỏng tính năng cao điều chế (cột C18, sử dụng gradien từ nước đến axetonitril chứa 0,05% HCl). Các phân đoạn tốt nhất được gộp lại và được cô trong chân không để thu được hợp chất có công thức 12.

LC-MS $m/z = 256$ (M+H)

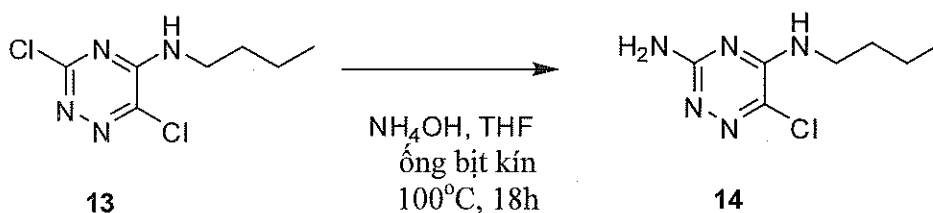
^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ ppm 4,49 (m, 1 H), 4,02 (s, 3 H), 3,63 (m, 2 H), 1,84 (m, 2 H), 1,68 (m, 2 H), 1,33 (m, 4 H), 0,93 (t, 3H).

Điều chế hợp chất có công thức 13



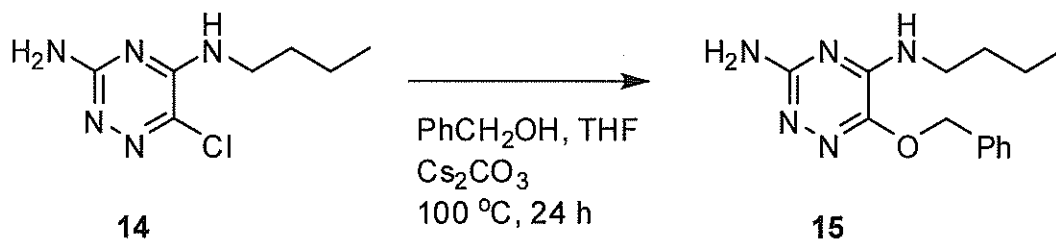
Hợp chất trung gian 13 được điều chế theo phương pháp điều chế hợp chất có công thức 5.

Điều chế hợp chất có công thức 14



Hợp chất trung gian 14 được điều chế theo phương pháp điều chế hợp chất có công thức 6.

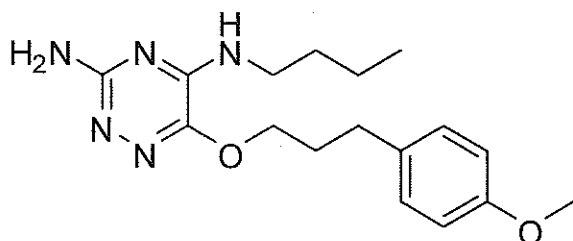
Điều chế hợp chất có công thức 15



Trong ống bịt kín, hỗn hợp chứa 14 (100 mg, 0,5mmol), rượu benzylic (0,52 mL, 5mmol) và xesi cacbonat (814,5 mg, 2,5mmol) trong THF khan (1 mL) được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước (1 mL) và được chiết bằng etyl axetat (3 x 10 mL). Các phần chiết

hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và nước muối, được làm khô (MgSO₄), các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi chứa phần dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng silicagel sắc ký sử dụng gradient từ ete dầu mỏ đến etyl axetat để thu được dầu màu vàng, 15 (67,7 mg, 0,25mmol).

Điều chế hợp chất có công thức 16

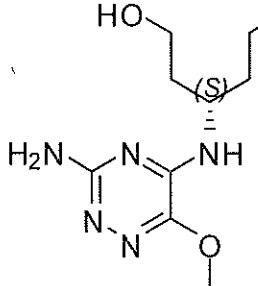
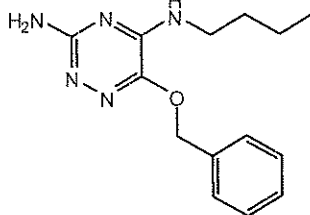
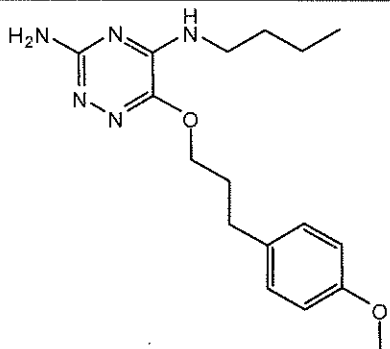
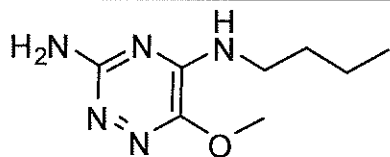


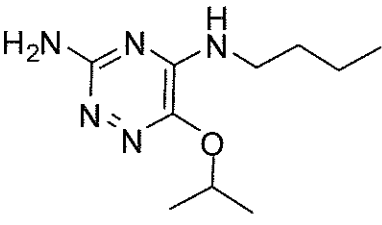
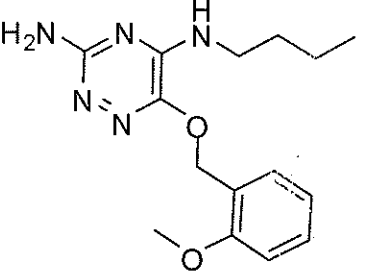
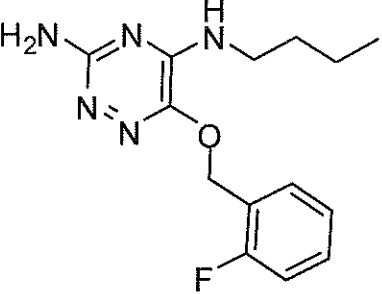
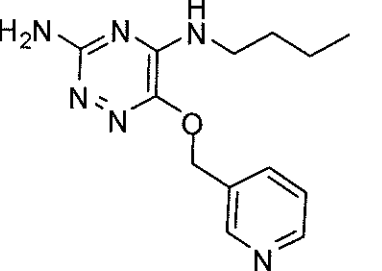
16

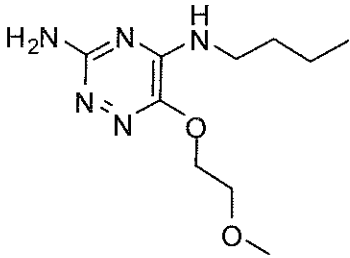
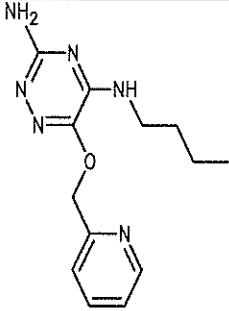
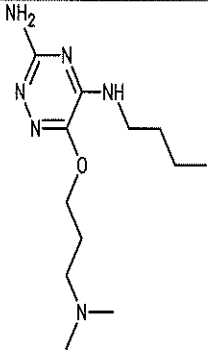
Hợp chất có công thức 16 được điều chế theo phương pháp điều chế hợp chất có công thức 15.

Bảng I: Các hợp chất có công thức (I). Các hợp chất sau được tổng hợp theo một trong số các phương pháp nêu trên.

#	Cấu trúc	¹ H NMR	Phương pháp LC, Thời gian lưu (phút)	Khối lượng phát hiện được (M+H)
8		¹ H NMR (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄) δppm 8,56 (d, 1 H), 7,73 (d, 1 H), 5,69 (s, 2 H), 4,54 (m, 1 H), 4,25 (s, 3 H), 4,06 (s, 3 H), 3,65 (m, 2 H), 1,75 (m, 4 H), 1,35 (m, 2 H), 0,94 (t, 3H) proton có thể trao đổi không thấy được.	A, 3,30	379

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Thời gian lưu (phút)	Khối lượng phát hiện được (M+H)
12		^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ ppm 4,49 (m, 1 H), 4,02 (s, 3 H), 3,63 (m, 2 H), 1,84 (m, 2 H), 1,68 (m, 2 H), 1,33 (m, 4 H), 0,93 (t, 3H) proton có thể trao đổi không thấy được.	A, 3,55	256
15		^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,48 (d, J = 7,25 Hz, 2H), 7,35 - 7,42 (m, 3H), 7,27 - 7,34 (m, 1H), 5,71 (s, 2H), 5,32 (s, 2H), 3,23 - 3,35 (m, 2H), 1,51 (quin, J = 7,25 Hz, 2H), 1,20 - 1,33 (m, 2H), 0,88 (t, J = 7,25 Hz, 3H)	B ,2,61	274
16		^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,25 (t, J = 5,67 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 8,51 Hz, 2H), 6,84 (d, J = 8,51 Hz, 2H), 5,66 (s, 2H), 4,16 (t, J = 6,46 Hz, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,26 - 3,35 (m, 2H), 2,69 (t, J = 7,57 Hz, 2H), 1,95 - 2,03 (m, 2H), 1,48 - 1,56 (m, 2H), 1,25 - 1,33 (m, 2H), 0,89 (t, J = 7,41 Hz, 3H)	B ,2,79	332
17		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,96 (t, J =7,4 Hz, 3 H), 1,33 - 1,45 (m, 2 H), 1,57 - 1,71 (m, 2 H), 3,53 (t, J =7,3 Hz, 2 H), 3,99 (s, 3 H), proton có thể trao đổi không thấy được.	A, 3,26	198

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Thời gian lưu (phút)	Khối lượng phát hiện được (M+H)
18		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,99 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,35 - 1,44 (m, 2 H), 1,44 (d, $J=1,0$ Hz, 6 H), 1,59 - 1,75 (m, 2 H), 3,55 (t, $J=7,4$ Hz, 2 H), 5,07 - 5,22 (m, 1 H), proton có thể trao đổi không thấy được.	A, 3,94	226
19		^1H NMR (400 MHz, CLOROFOM- d) δ ppm 0,86 (t, $J=7,3$ Hz, 3 H), 1,23 - 1,36 (m, 2 H), 1,44 - 1,56 (m, 2 H), 3,27 - 3,37 (m, 2 H), 3,77 (s, 3 H), 4,44 (br. s., 2 H), 5,36 (s, 2 H), 5,47 (br. s., 1 H), 6,81 - 6,93 (m, 2 H), 7,27 (td, $J=7,9$, 1,8 Hz, 1 H), 7,32 (dd, $J=7,3$, 1,5 Hz, 1 H)	C, 3,38	304
20		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,97 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,32 - 1,45 (m, 2 H), 1,58 - 1,69 (m, 2 H), 3,53 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H), 5,45 (s, 2 H), 7,13 - 7,21 (m, 1 H), 7,25 (td, $J=7,5$, 1,0 Hz, 1 H), 7,41 - 7,49 (m, 1 H), 7,61 (td, $J=7,5$, 1,8 Hz, 1 H) proton có thể trao đổi không thấy được.	C, 3,36	292
21		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,96 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,33 - 1,47 (m, 2 H), 1,60 - 1,73 (m, 2 H), 3,57 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H), 5,65 (s, 2 H), 8,20 (dd, $J=7,9$, 5,9 Hz, 1 H), 8,86 (d, $J=7,8$	D, 4,34	275

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Thời gian lưu (phút)	Khối lượng phát hiện được (M+H)
		Hz, 1 H), 8,92 (d, $J=5,5$ Hz, 1 H), 9,17 (s, 1 H) proton có thể trao đổi không thấy được.		
22		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,97 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,34 - 1,45 (m, 2 H), 1,65 (t, $J=7,4$ Hz, 2 H), 3,54 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H), 3,79 (dd, $J=5,3, 3,5$ Hz, 2 H), 4,40 - 4,47 (m, 2 H) proton có thể trao đổi không thấy được.	D, 3,99	242
23		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 0,98 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,42 (dd, $J=15,1, 7,3$ Hz, 2 H), 1,64 (quin, $J=7,4$ Hz, 2 H), 3,40 - 3,52 (m, 2 H), 4,62 (br. s., 2 H), 4,81 (br. s., 1 H), 5,41 - 5,53 (m, 2 H), 7,34 - 7,47 (m, 1 H), 7,60 (d, $J=7,8$ Hz, 1 H), 7,89 (td, $J=7,8, 1,8$ Hz, 1 H), 8,57 (d, $J=4,5$ Hz, 1 H)	A, 2,91	275
24		^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 1,00 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,34 - 1,51 (m, 2 H), 1,70 (t, $J=7,3$ Hz, 2 H), 2,31 (dd, $J=10,0, 5,5$ Hz, 2 H), 2,89 - 3,00 (m, 6 H), 3,39 - 3,47 (m, 2 H), 3,59 (t, $J=7,4$ Hz, 2 H), 4,44 (t, $J=5,8$ Hz, 2 H), proton có thể trao đổi không quan sát được.	D, 4,6	269

Các phương pháp phân tích.

Tất cả các hợp chất được xác định đặc điểm theo phương pháp LC-MS sau.

Phương pháp A

Cột	YMC-PACK ODS-AQ, 50 x 2,0mm 5µm		
Pha động	A :H ₂ O(0,1%TFA)		
	B:CH ₃ CN(0,05%TFA)		
	Thời gian (phút)	A%	B%
	0	100	0
	1	100	0
	5	40	60
	7,5	40	60
	8	100	0
Tốc độ chảy	0,8 mL/phút		
Bước sóng	UV 220 nm		
Nhiệt độ cột	50°C		
Tính phân cực MS	dương		
LC-MS	Agilent 1100		

Phương pháp B

Pha đảo UPLC trên cột C18 của thiết bị Waters Acquity BEH (thể lai etylsiloxan/silic oxit liên kết cầu) (1,7µm, 2,1 x 100mm) với tốc độ chảy 0,343 mL/phút. Hai pha động (pha động A: 95% amoni axetat 7mM/5% axetonitril; pha động B: 100% axetonitril) được sử dụng để chạy với chế độ gradien từ 84,2% A đến 15,8% B (được giữ trong thời gian 0,49 phút) đến 10,5% A và 89,5% B trong 2,18 phút, được giữ trong thời gian 1,94 phút và trở lại các điều kiện ban đầu trong 0,73 phút, được giữ trong thời gian 0,73 phút. Thể tích phun 2µL được sử dụng. Điện áp là 20V đối với chế độ ion hoá dương và âm. Phổ khối được ghi lại bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong 0,2 giây sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,1 giây.

Phương pháp C

Cột	YMC-PACK ODS-AQ, 50 x 2,0mm 5 μ m		
Pha động	A :H ₂ O(0,1%TFA)		
	B:CH ₃ CN(0,05%TFA)		
	Thời gian (phút)	A%	B%
	0	90	10
	0,8	90	10
	4,5	20	80
	7,5	20	80
	8	90	10
Tốc độ chảy	0,8 mL/phút		
Bước sóng	UV 220 nm		
Nhiệt độ lò	50°C		
Tính phân cực MS	dương		
LC-MS	Agilent 1100		

Phương pháp D

Cột	Ultimate XB-C18, 50 x 2,1mm 5 μ m		
Pha động	C :H ₂ O(10mmol/L NH ₄ HCO ₃)		
	D:CH ₃ CN		
	Thời gian (phút)	C%	D%
	0	100	0
	1	100	0
	5	40	60
	7,5	40	60
	8	100	0
Tốc độ chảy	0,8 mL/phút		
Bước sóng	UV 220 nm		
Nhiệt độ lò	50°C		
Tính phân cực MS	dương		
LC-MS	Agilent 1100		

Hoạt tính sinh học của các hợp chất có công thức (I)

Mô tả các thử nghiệm sinh học

Đánh giá hoạt tính TLR7 và TLR8

Khả năng của các hợp chất trong việc hoạt hóa TLR7 và/hoặc TLR8 ở người được đánh giá trong thử nghiệm báo cáo tế bào (cellular reporter assay) bằng cách sử dụng các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm tạm thời với vector biểu hiện TLR7 hoặc TLR8 và cấu trúc thông báo NF κ B-luc.

Vấn tắt, các tế bào HEK293 được sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy (DMEM có bổ sung 10% FCS và 2 mM Glutamin). Để chuyển nhiễm các tế bào trong các đĩa loại 10cm, các tế bào được tách rời ra bằng Trypsin-EDTA, được chuyển nhiễm với hỗn hợp chứa plasmit CMV-TLR7 hoặc TLR8 (750 ng), plasmit NF κ B-luc (375 ng) và chất phản ứng chuyển nhiễm và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong môi trường ẩm chứa 5% CO₂. Sau đó, các tế bào đã được chuyển nhiễm được tách rời ra bằng Trypsin-EDTA, được rửa trong PBS và được tái tạo huyền phù trong môi trường với mật độ $1,67 \times 10^5$ tế bào/mL. Sau đó, 30 microlit tế bào được phân vào mỗi lỗ trong đĩa 384 lỗ, trong đó đã có 10 μ L hợp chất trong DMSO 4%. Sau 6 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách bổ sung 15 μ L cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và việc đọc kết quả được tiến hành trên bộ tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Đường cong đáp ứng liều lượng được tạo ra từ các số đo được tiến hành làm bốn lần. Các trị số nồng độ hữu hiệu thấp nhất (LEC), được xác định là nồng độ gây ra tác động gấp ít nhất hai lần so với độ lệch chuẩn của thử nghiệm, được xác định đối với mỗi hợp chất.

Độc tính của hợp chất được xác định song song bằng cách sử dụng các dung dịch pha loãng tương tự của hợp chất với 30 μ L cho mỗi lỗ chứa các tế bào được chuyển nhiễm với một mình cấu trúc CMV-TLR7 ($1,67 \times 10^5$ tế bào/mL), trong đĩa 384 lỗ. Khả năng sống sót của tế bào được đo sau 6 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ bằng cách bổ sung 15 μ L ATP lite (Perkin Elmer) cho mỗi lỗ và đọc trên bộ tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Dữ liệu được báo cáo dưới dạng CC₅₀.

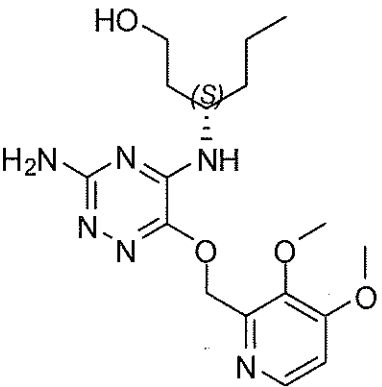
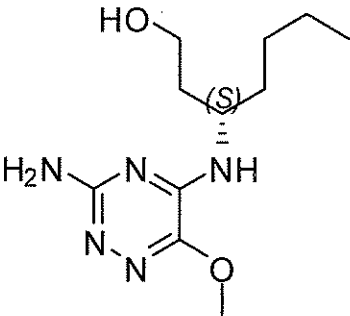
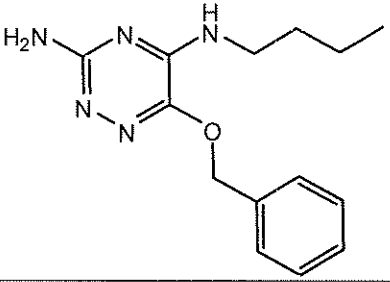
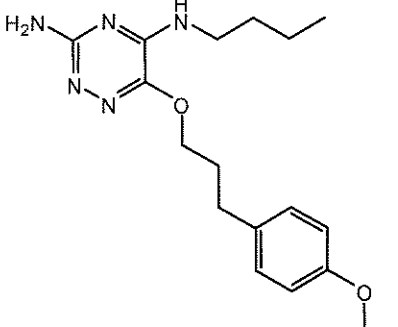
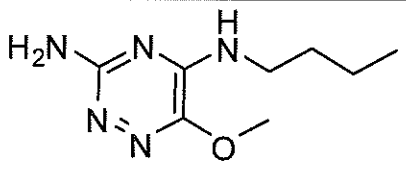
Một cách song song, các dung dịch pha loãng tương tự của hợp chất được sử dụng (10 μ L hợp chất trong 4% DMSO) với 30 μ L cho mỗi lỗ chứa các tế bào được chuyển nhiễm với một mình cấu trúc thông báo NF κ B-luc ($1,67 \times 10^5$ tế bào/mL). 6 giờ sau khi ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách bổ sung 15 μ L cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và việc đọc kết quả được tiến hành trên bộ tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Dữ liệu sàng lọc phần tử không mong muốn được báo cáo dưới dạng LEC.

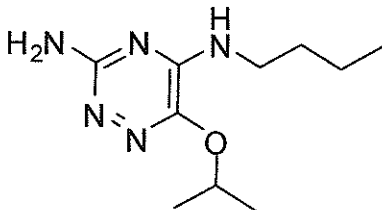
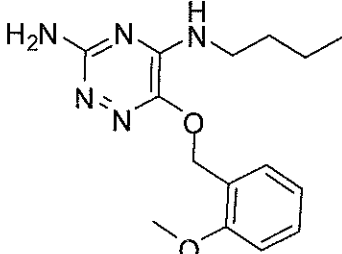
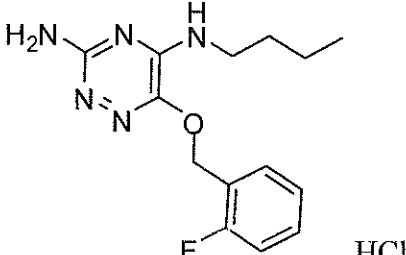
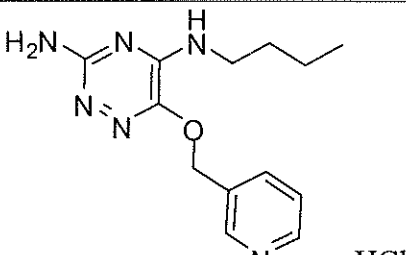
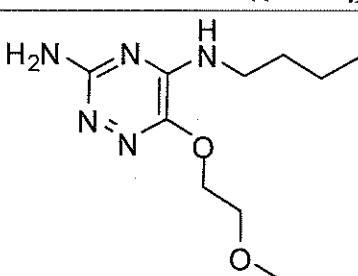
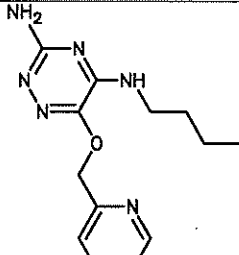
Hoạt hóa yếu tố thúc đẩy ISRE

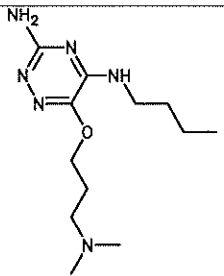
Hiệu lực của các hợp chất trong việc cảm ứng IFN-I cũng được đánh giá bằng cách đo mức độ hoạt hóa của các yếu tố đáp ứng được kích thích bằng interferon (interferon-stimulated responsive elements/ISRE) bằng cách môi trường điều hòa từ PBMC. Yếu tố ISRE có trình tự GAAACTGAAACT là đáp ứng cao với yếu tố phiên mã STAT1-STAT2-IRF9, được hoạt hoá khi gắn kết IFN-I với thụ thể IFNAR của nó (Clontech, PT3372-5W). Plasmid pISRE-Luc từ Clontech (có số nộp lưu: 631913) chứa 5 bản sao của yếu tố ISRE này, tiếp đó là firefly luxiferaza ORF. Dòng tế bào HEK293 được chuyển nhiễm ổn định với pISRE-Luc (HEK-ISREluc) được tạo lập để xác định đặc tính của môi trường nuôi cấy PBMC điều hòa.

Vấn tắt, PBMC được tạo ra từ lớp đệm bao gồm ít nhất hai vật cho bằng cách sử dụng quy trình ly tâm Ficoll chẵn. PBMC đã được phân lập được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI có bổ sung 10% huyết thanh AB người và 2×10^5 tế bào/lỗ được phân vào đĩa 384 lỗ chứa các hợp chất (tổng thể tích 70 mL). Sau khi ủ qua đêm, 10 μ L dịch nổi trên bề mặt được chuyển đến đĩa 384 lỗ chứa 5×10^3 tế bào HEK-ISREluc/lỗ trong 30 μ L (được dàn mỏng vào ngày trước đó). Sau 24 giờ ủ, mức độ hoạt hóa của các yếu tố ISRE được đo bằng cách tiến hành thử nghiệm hoạt tính luxiferaza bằng cách sử dụng 40 μ L/lỗ cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) và được đo bằng bộ tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Hoạt tính kích thích của mỗi hợp chất đối với các tế bào HEK-ISREluc được báo cáo dưới dạng giá trị LEC, được xác định là nồng độ hợp chất được áp dụng cho PBMC để tạo ra hoạt tính luxiferaza gấp ít nhất hai lần độ lệch chuẩn của thử nghiệm. LEC cho biết mức độ hoạt hóa ISRE khi chuyển lượng định trước môi trường nuôi cấy PBMC. Interferon tái tổ hợp α -2a (Roferon-A) được sử dụng làm hợp chất đối chứng chuẩn.

Bảng II
Hoạt tính sinh học

#	Cấu trúc	TLR ở người 7 (LEC) μM	TLR 8 ở người (LEC) μM	HEK-ISRE luc (LEC) μM
8		0,24	0,56	0,014
12		7,8	5,87	2,72
15		2,94	1,93	1,85
16		0,38	0,81	0,14
17		17,49	2,04	1,02

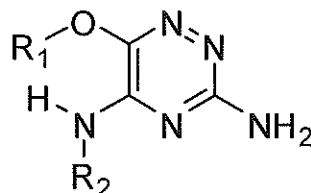
#	Cấu trúc	TLR ở người 7 (LEC) μM	TLR 8 ở người (LEC) μM	HEK-ISRE luc (LEC) μM
18		8,27	0,46	0,53
19		0,66	0,64	0,43
20		0,75	0,56	0,54
21		1,71	0,59	0,14
22		4,75	1,0	0,41
23		0,17	0,33	0,14

#	Cấu trúc	TLR ở người 7 (LEC) μM	TLR 8 ở người (LEC) μM	HEK-ISRE luc (LEC) μM
24	 <chem>CCCCNC1=NC(=C2C(=N1)N=CN=C2C(=O)OCCCN(C)C)N</chem> .HCl	>25	0,1	0,17

Tất cả các hợp chất đều không thể hiện độc tính ở nồng độ thử nghiệm cao nhất. Tất cả các hợp chất đều không thể hiện hoạt tính (LEC >25 μM) trong thử nghiệm sàng lọc phần tử không mong muốn (Counterscreen) HEK 293 NF-kB nêu trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I);



hoặc muối, chất hỗn biến, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó, trong đó:

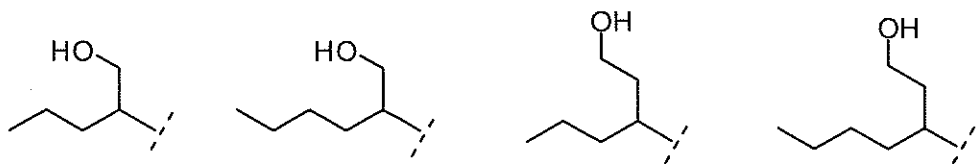
R₁ là C₁₋₆alkyl, arylalkyl, hoặc heteroarylalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C₁₋₆ alkyl, đi-(C₁₋₆)alkylamino, C₁₋₆ alkylamino, C₁₋₆ alkoxy, C₃₋₆ xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, carboxylic amit, dị vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl, và nitril, và

R₂ là C₁₋₈ alkyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C₁₋₃ alkyl, C₁₋₃ alkoxy, C₃₋₆ xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, carboxylic amit, đi-(C₁₋₆)alkylamino, C₁₋₆ alkylamino, aryl, heteroaryl, heteroarylalkyl và nitril.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₂ là butyl hoặc pentyl và R₁ là C₁₋₆alkyl, arylalkyl, heteroarylalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C₁₋₆ alkyl, đi-(C₁₋₆)alkylamino, C₁₋₆ alkylamino, C₁₋₆ alkoxy, C₃₋₆ xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, carboxylic amit, dị vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl, và nitril.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₂ là C₁₋₈ alkyl được thế bằng hydroxyl, và trong đó R₁ là nhóm arylalkyl được thế hoặc không được thế.

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₁ là arylalkyl và R₂ là C₁₋₈ alkyl được thế bằng hydroxyl, hoặc một trong số các cấu hình hóa học lập thể bất kỳ sau:

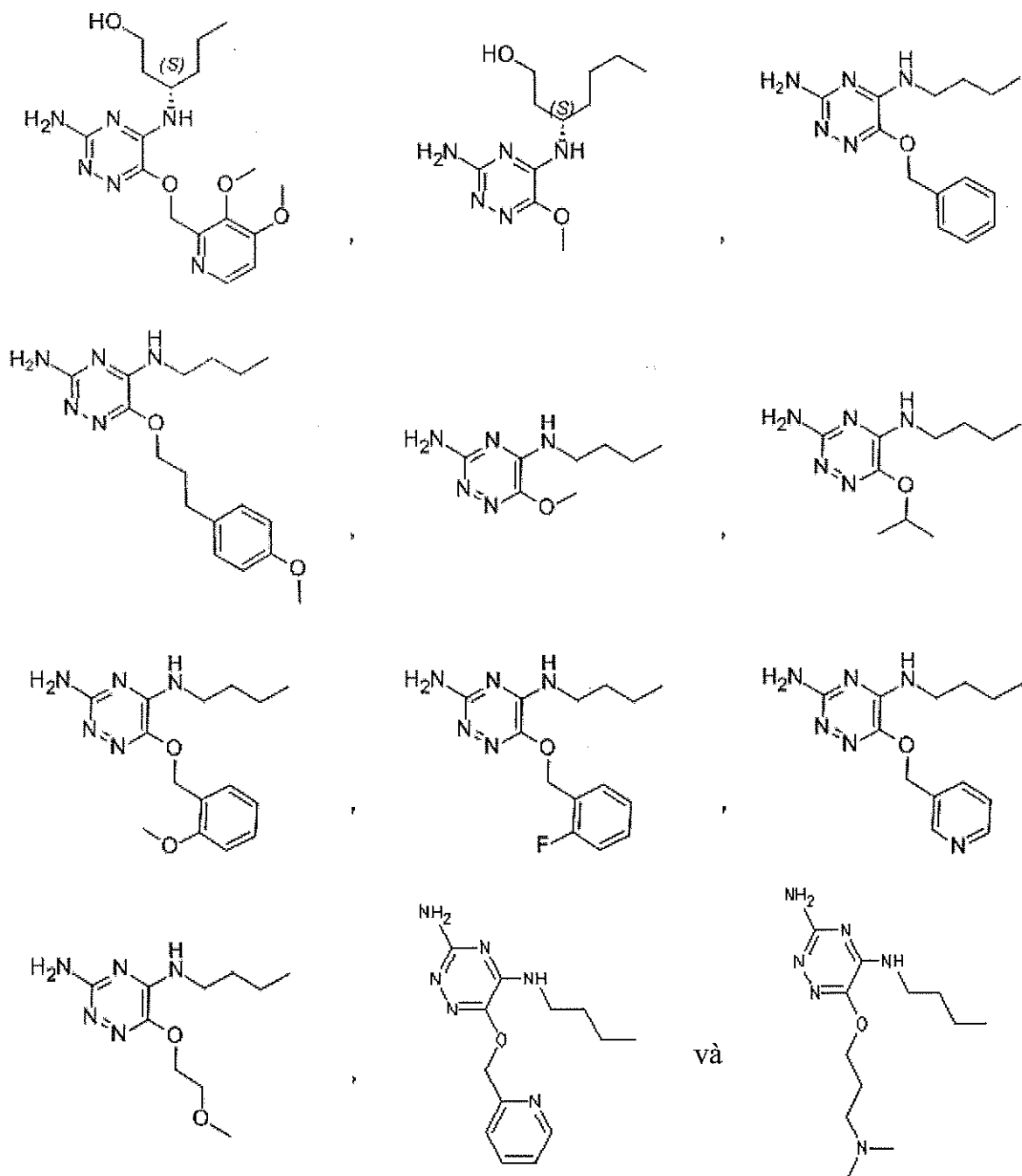


5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₁ là CH₃ và trong đó R₂ là C₁₋₈ alkyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C₁₋₃ alkyl, C₁₋₃ alkoxy, C₃₋₆ xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit

carboxylic, carboxylic amit, đi-(C₁₋₆)alkylamino, C₁₋₆ alkylamino, aryl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril.

6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₁ là heteroarylalkyl, và trong đó R₂ là C₁₋₈ alkyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C₁₋₃ alkyl, C₁₋₃ alkoxy, C₃₋₆ xycloalkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, carboxylic amit, đi-(C₁₋₆)alkylamino, C₁₋₆ alkylamino, aryl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril.

7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ các hợp chất sau:



8. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, chất hỗ biến, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.