



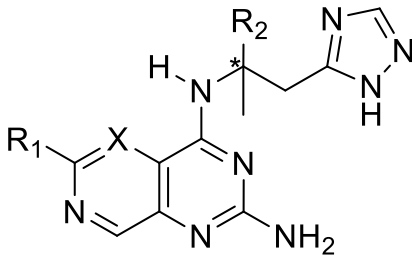
- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ 1-0043511
(51)^{2020.01} C07D 471/04; C07D 249/08; A61K (13) B
31/519; A61P 31/12
-

- (21) 1-2021-02074 (22) 19/09/2019
(86) PCT/CN2019/106687 19/09/2019 (87) WO 2020/057604 26/03/2020
(30) 201811094969.4 19/09/2018 CN
(45) 25/02/2025 443 (43) 27/09/2021 402A
(73) CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (CN)
No.369 Yuzhou South Rd. Lianyungang, Jiangsu, 222062, China
(72) CAI, Zhe (CN); SUN, Fei (CN); DING, Charles Z. (US); CHEN, Shuhui (US).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

- (54) CHẤT CHỦ VẬN THỤ THỂ GIỐNG TOLL 8 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT NÀY

(21) 1-2021-02074

(57) Sáng chế đề cập đến chất chủ vận thụ thể giống Toll 8 (Toll-like receptor 8, TLR8), hợp chất này có cấu trúc được thể hiện trong công thức (I), chất đồng phân của nó, hoặc muối được dụng của nó.



(I)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất chủ vận thụ thể giống Toll 8 (toll-like receptor 8, TLR8) mới, và cụ thể là đề cập đến: hợp chất có công thức (I), chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó; dược phẩm chứa hợp chất này hoặc muối được dụng của nó; và sử dụng hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó và dược phẩm này để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đáp ứng với sự chủ vận TLR8.

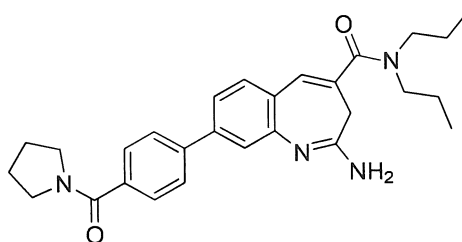
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thụ thể giống Toll (Toll-like receptor, TLR) là một nhóm phân tử protein quan trọng tham gia vào tính miễn dịch không đặc hiệu (tính miễn dịch bẩm sinh), và còn là cầu nối liên kết tính miễn dịch không đặc hiệu và tính miễn dịch đặc hiệu. TLR là các protein không xúc tác xuyên màng đơn được biểu hiện chủ yếu trong một loạt các tế bào miễn dịch như các tế bào đuôi gai, các đại thực bào, các bạch cầu đơn nhân, các tế bào T, các tế bào B, và các tế bào NK. TLR có khả năng nhận biết các phân tử có các cấu trúc được bảo toàn có nguồn gốc từ các vi sinh vật. Chúng có thể nhận biết các vi sinh vật và hoạt hóa cơ thể để tạo ra các phản ứng của tế bào miễn dịch khi các vi sinh vật phá vỡ các hàng rào vật lý của cơ thể, như da và niêm mạc. Ví dụ, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 và TLR6 chủ yếu nhận biết các kích thích ngoại bào như lipopolysaccharit, lipopeptit, và flagellin của vi khuẩn, trong khi TLR3, TLR7, TLR8 và TLR9 hoạt động trong các nội thể tế bào, như liên kết với các phối tử của chúng sau khi thực bào và hòa tan vỏ bọc và nhận biết các axit nucleic của các vi sinh vật.

Trong số các loại khác nhau của TLR, TLR8 có các chức năng khác thường: TLR8 được biểu hiện chủ yếu trong các bạch cầu đơn nhân, các đại thực bào, và các tế bào đuôi gai của tủy. Con đường truyền tín hiệu của TLR8 có thể được hoạt hóa bởi các ARN sợi đơn của vi khuẩn, các chất chủ vận phân tử nhỏ, và các microARN. Sự hoạt hóa TLR8 dẫn đến sự sản sinh các xytokin phân cực Th1 như IL-12, IL-18, TNF- α và IFN- γ , và các yếu tố đồng kích thích khác nhau như CD80 và CD86. Các xytokin này có thể hoạt hóa và khuếch đại các phản ứng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng và tạo ra chế độ điều trị có lợi đối với các bệnh liên quan đến sự kháng virus, chống nhiễm trùng, tự miễn dịch, khối u, và tương tự. Ví dụ, đối với bệnh viêm gan B, sự hoạt hóa TLR8 đối với các tế bào trình diện kháng nguyên và các tế bào miễn dịch khác trong gan có thể hoạt hóa các xytokin như IL-

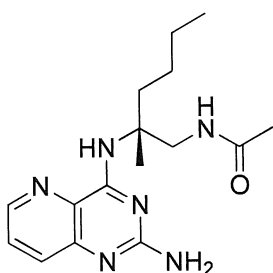
12, đến lượt mình chúng hoạt hóa các tế bào T đặc hiệu và các tế bào NK mà bị cạn kiệt bởi virus, nhờ đó khôi phục tính miễn dịch kháng virus trong gan.

Chất chủ vận TLR8 chọn lọc VTX-2337 của VentiRX Pharmaceuticals được sử dụng lần đầu tiên trong lâm sàng để đánh giá các khối u khác nhau, và chế độ sử dụng của VTX-2337 là tiêm dưới da. Gilead Sciences thông báo chất chủ vận TLR8 dùng qua đường miệng để điều trị bệnh viêm gan B mạn tính, chất này hiện đang ở giai đoạn lâm sàng II. Tuy nhiên, cấu trúc của nó vẫn chưa được bộc lộ.

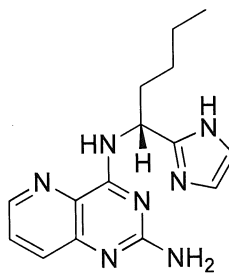


VTX-2337

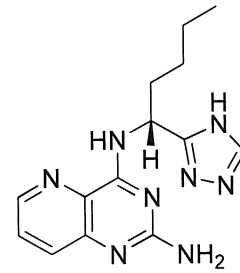
Một loạt các chất chủ vận TLR8 được thông báo trong WO2016141092 của Gilead Sciences, như công thức 1 có AC_{50} bằng $0,02\mu M$ trong việc chủ vận TLR8 để gây ra sự sản sinh xytokin đặc hiệu IL-12p40 (dữ liệu được viện dẫn từ bảng 1 của WO2016141092), trong đó AC_{50} là nồng độ của hợp chất tương ứng với tác dụng chủ vận nửa tối đa. Trong WO2016141092, các hợp chất chứa các dị vòng nitơ có năm cạnh cũng được thông báo, như công thức 2 và công thức 3. Tuy nhiên, công thức 2 và công thức 3 có hoạt tính yếu trong việc chủ vận TLR8 để gây ra sự sản sinh xytokin đặc hiệu IL-12p40, với AC_{50} lần lượt bằng $21,5\mu M$ và $3,4\mu M$ (dữ liệu được viện dẫn từ bảng 1 của WO2016141092). Công thức 1, công thức 2 và công thức 3 lần lượt là các ví dụ 61, 55 và 56 được bộc lộ trong WO2016141092.



Công thức 1



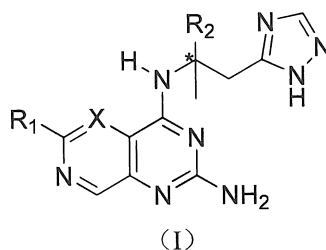
Công thức 2



Công thức 3

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó,



trong đó,

nguyên tử cacbon có dấu "*" có thể là nguyên tử cacbon không đối xứng có mặt ở dạng chất đồng phân đối ảnh (*R*) hoặc (*S*) đơn hoặc ở dạng được làm giàu một chất đồng phân đối ảnh;

X được chọn từ nhóm bao gồm N và CH;

R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, CN, C₁₋₆ alkyl, C₃₋₆ xycloalkyl, -N(R_a)(R_b) và -O(R_c), nhóm C₁₋₆ alkyl và C₃₋₆ xycloalkyl này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_d;

R₂ là C₁₋₆ alkyl, nhóm C₁₋₆ alkyl này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_e;

mỗi nhóm R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I,

OH, CN, NH₂, CH₃, , , , , , , ,  và

, nhóm CH₃, , , , , , , ,  và

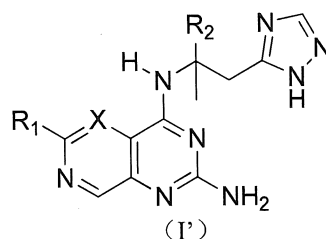
 này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R; và

mỗi nhóm R độc lập được chọn từ nhóm bao gồm F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃,

, , , , , , , , , , ,

, , , ,  và .

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I'), chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó,



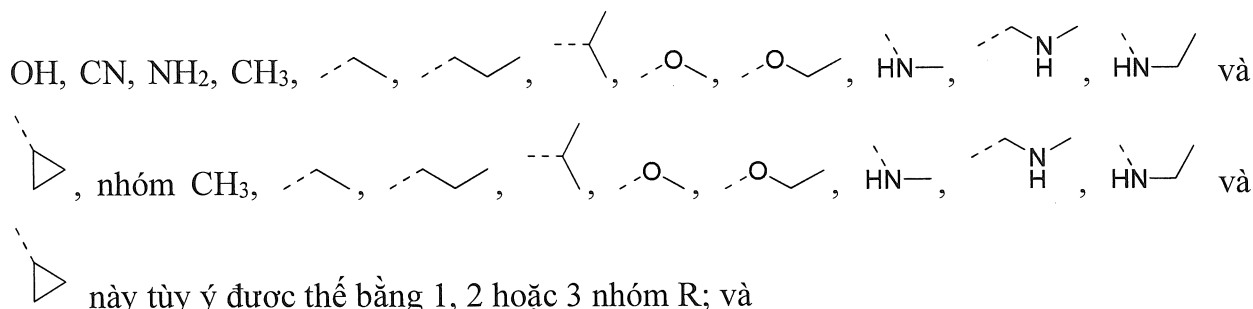
trong đó,

X được chọn từ nhóm bao gồm N và CH;

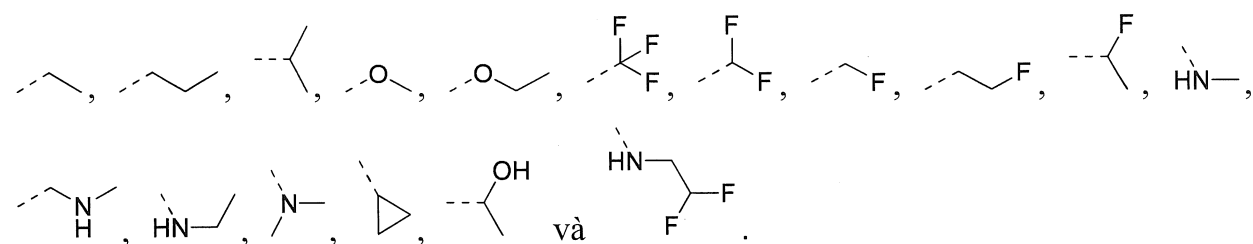
R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, CN, C₁₋₆ alkyl, C₃₋₆ xycloalkyl, -N(R_a)(R_b) và -O(R_c), nhóm C₁₋₆ alkyl và C₃₋₆ xycloalkyl này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_d;

R₂ là C₁₋₆ alkyl, nhóm C₁₋₆ alkyl này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_e;

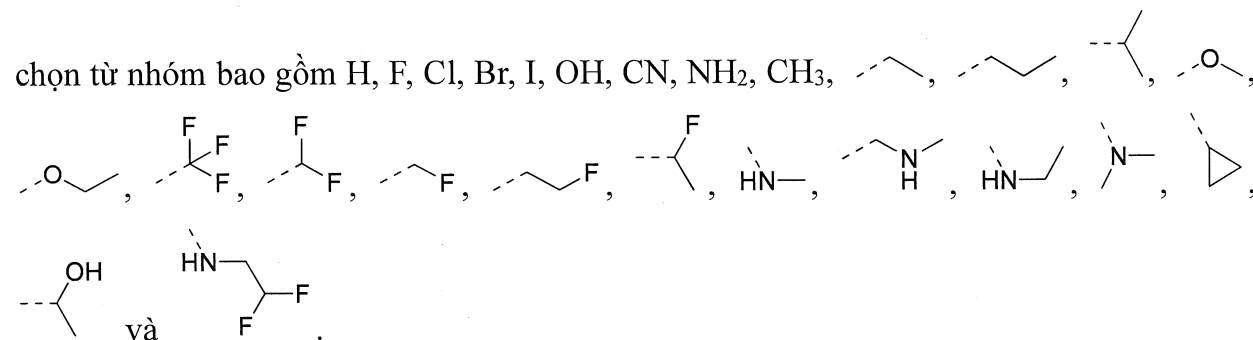
mỗi nhóm R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I,



mỗi nhóm R độc lập được chọn từ nhóm bao gồm F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃,



Theo một số phương án của sáng chế, mỗi nhóm R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃,

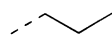
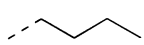
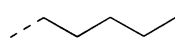
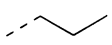
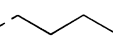
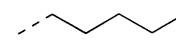


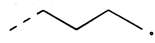
Theo một số phương án của sáng chế, R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I,

CN, CH₃, , , , xyclopentyl, xyclobutyl, , , NH₂, ,  và , nhóm CH₃, , , , xyclopentyl và xyclobutyl này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_d.

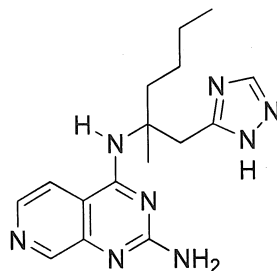
Theo một số phương án của sáng chế, R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I,

CH₃ và .

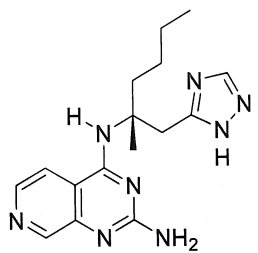
Theo một số phương án của sáng chế, R₂ được chọn từ nhóm bao gồm ,  và , nhóm ,  và  này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_e.

Theo một số phương án của sáng chế, R₂ là .

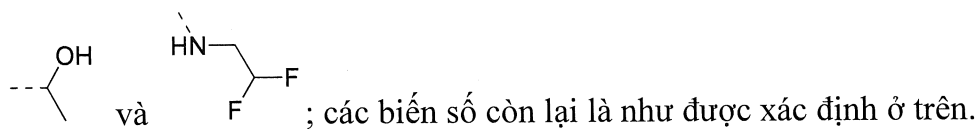
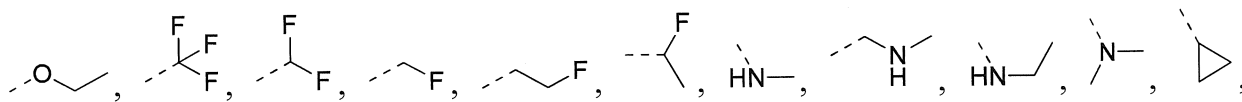
Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức dưới đây, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó,



Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó, được chọn từ



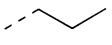
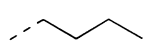
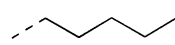
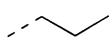
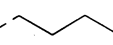
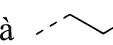
Theo một số phương án của sáng chế, mỗi nhóm R_a, R_b, R_c, R_d và R_e độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃, , , , ,

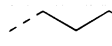


Theo một số phương án của sáng chế, R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, CN, CH₃, , , , xyclopentyl, xyclobutyl, , , NH₂, HN-, HN- và , nhóm CH₃, , , , xyclopentyl và xyclobutyl này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_d.

Theo một số phương án của sáng chế, R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I,

CH₃ và ; các biến số còn lại là như được xác định ở trên.

Theo một số phương án của sáng chế, R₂ được chọn từ nhóm bao gồm ,  và , nhóm ,  và  này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_e; các biến số còn lại là như được xác định ở trên.

Theo một số phương án của sáng chế, R₂ là ; các biến số còn lại là như được xác định ở trên.

Một số phương án khác của sáng chế có thể thu được bằng cách tổ hợp tùy ý các biến số nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, được phẩm được bộc lộ ở đây còn bao gồm tá được dụng dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chủ vận TLR8, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị (tốt hơn là người) sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất, chất đồng phân của nó, muối được dụng của nó, hoặc được phẩm của nó được bộc lộ ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đáp ứng với sự chủ vận TLR8, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị (tốt hơn là người) sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất, chất đồng phân của nó, muối được dụng của nó, hoặc được phẩm của nó được bộc lộ ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất, chất đồng phân của nó, muối được dụng của nó, hoặc được phẩm của nó được bộc lộ ở đây để sản xuất thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đáp ứng với sự chủ vận TLR8.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất, chất đồng phân của nó, muối được dụng của nó, hoặc được phẩm của nó được bộc lộ ở đây để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đáp ứng với sự chủ vận TLR8.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất, chất đồng phân của nó, muối được dụng của nó, hoặc được phẩm của nó được bộc lộ ở đây dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đáp ứng với sự chủ vận TLR8.

Theo một số phương án của sáng chế, bệnh đáp ứng với sự chủ vận TLR8 là bệnh nhiễm virus.

Theo một số phương án của sáng chế, bệnh nhiễm virus là bệnh nhiễm virus gây bệnh viêm gan B (hepatitis B, virus HBV).

Hiệu quả của sáng chế

Hợp chất được bộc lộ ở đây có hoạt tính chủ vận đáng kể đối với TLR8. Hợp chất được bộc lộ ở đây có hoạt tính chủ vận mong muốn và tính chọn lọc đặc hiệu đối với TLR8. Hợp chất được bộc lộ ở đây có hoạt tính mong muốn đối với việc cảm ứng các xytokin đặc hiệu của con đường TLR8 (IL-12p40, IFN- γ). Nghiên cứu dược động học ở chuột nhắt cho thấy rằng hợp chất được bộc lộ ở đây có độ sinh khả dụng qua đường miệng và sự tiếp xúc với dược chất vừa phải, và do đó việc sử dụng qua đường miệng là khả thi. Chất chủ vận TLR8 là một chất điều biến miễn dịch, và sự tiếp xúc quá mức của nó có thể dẫn tới sự hoạt hóa miễn dịch quá mức của cơ thể, dẫn đến các tác dụng phụ không thể đoán trước.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, các thuật ngữ và cụm từ sau đây được sử dụng ở đây được dự định có các nghĩa sau đây. Thuật ngữ hoặc cụm từ cụ thể, nếu không được định nghĩa cụ thể theo cách khác, không được cho là không chắc chắn hoặc không rõ ràng, mà được hiểu theo nghĩa thông thường của nó. Khi nói đến nhãn hiệu hàng hóa, dự định là nói tới sản phẩm thương mại tương ứng của nó hoặc thành phần hoạt tính của nó.

Thuật ngữ "dược dụng" được sử dụng ở đây đối với các hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm, và/hoặc dạng liều mà, trong phạm vi của quyết định y tế hợp lý, là thích hợp để sử dụng tiếp xúc với các mô của người và động vật mà không có độc tính, tính kích ứng, phản ứng dị ứng quá mức, hoặc các vấn đề hoặc các biến chứng khác, và tương xứng với tỷ số lợi ích/rủi ro hợp lý.

Thuật ngữ "muối dược dụng" để chỉ muối của hợp chất được bộc lộ ở đây, muối này được điều chế từ hợp chất có các nhóm thế cụ thể được bộc lộ ở đây và axit hoặc bazơ tương đối không độc. Khi hợp chất được bộc lộ ở đây chứa nhóm chức tương đối axit, muối cộng bazơ có thể thu được bằng cách cho dạng trung tính của hợp chất này tiếp xúc với lượng đủ của bazơ trong dung dịch tinh khiết hoặc dung môi thích hợp. Khi hợp chất được bộc lộ ở đây chứa nhóm chức tương đối bazơ, muối cộng axit có thể thu được bằng cách cho dạng trung tính của hợp chất này tiếp xúc với lượng đủ của axit trong dung dịch tinh khiết hoặc dung môi thích hợp. Các ví dụ về muối cộng axit dược dụng bao gồm các muối axit vô cơ hoặc các muối axit hữu cơ.

Các muối dược dụng được bộc lộ ở đây có thể được tổng hợp từ hợp chất gốc có nhóm axit hoặc bazơ bằng các phương pháp hóa học thông thường. Nói chung, muối này

có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất ở dạng axit hoặc bazơ tự do phản ứng với lượng theo hệ số tỷ lượng của bazơ hoặc axit thích hợp trong nước hoặc dung môi hữu cơ hoặc hỗn hợp của hai chất này.

Các thuật ngữ "tùy ý" hoặc "theo cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả sau đó có thể, nhưng không nhất thiết, xảy ra. Phần mô tả bao gồm các trường hợp trong đó sự kiện hoặc tình huống này xảy ra và các trường hợp trong đó nó không xảy ra. Ví dụ, nếu etyl tùy ý được thế bằng halogen, điều này có nghĩa là etyl có thể là không được thế (CH_2CH_3), được thế một lần (ví dụ, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$), được thế nhiều lần (ví dụ, CHFCH_2F , CH_2CHF_2 và tương tự) hoặc được thế hoàn toàn (CF_2CF_3). Người có hiểu biết trong lĩnh vực này cần hiểu rằng đối với các nhóm bất kỳ bao gồm một hoặc nhiều nhóm thế, sự thế hoặc kiểu thế bất kỳ mà không thể tồn tại hoặc không thể được tổng hợp về mặt không gian không được đưa vào. Người có hiểu biết trong lĩnh vực này cần hiểu rằng khi một nhóm được thế bằng nhiều nhóm thế, số lượng nhóm thế có thể là 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều hơn, tối đa là tất cả các vị trí mà sự thế có thể xảy ra được thế. Ví dụ, khi etyl được thế bằng nhiều nguyên tử F, số lượng nguyên tử F có thể là 2, 3, 4 hoặc 5.

" C_{m-n} " được sử dụng ở đây có nghĩa là nhóm này có một số nguyên các nguyên tử cacbon trong khoảng được nêu. Ví dụ, " C_{1-6} " có nghĩa là nhóm này có thể có 1 nguyên tử cacbon, 2 nguyên tử cacbon, 3 nguyên tử cacbon, 4 nguyên tử cacbon, 5 nguyên tử cacbon hoặc 6 nguyên tử cacbon.

Các hợp chất được bộc lộ ở đây có thể có dạng đồng phân lập thể hoặc dị hình cụ thể. Tất cả các hợp chất này được dự định ở đây, bao gồm chất đồng phân cis và trans, chất đồng phân đối ảnh (-) và (+), chất đồng phân đối ảnh (*R*) và (*S*), chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân (*D*), chất đồng phân (*L*), và các hỗn hợp raxemic và các hỗn hợp khác của nó, như hỗn hợp được làm giàu chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang, tất cả các chất này được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Các nhóm thế như alkyl có thể có nguyên tử cacbon không đối xứng bổ sung. Tất cả các chất đồng phân này và các hỗn hợp của chúng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "chất đồng phân đối ảnh" hoặc "chất đồng phân dị cấu quang học" để chỉ các chất đồng phân lập thể là các ảnh gương của nhau.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "chất đồng phân cis-trans" hoặc "chất đồng phân dị hình" do liên kết đơn của nguyên tử cacbon của vòng hoặc liên kết đôi không thể quay tự do.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "chất đồng phân không đối quang" để chỉ các chất đồng phân lập thể trong đó mỗi phân tử có hai hoặc nhiều tâm không đối xứng và không là các ảnh gương của nhau.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, "(D)" hoặc "(+)" là viết tắt của quay phải, "(L)" hoặc "(-)" là viết tắt của quay trái, và "(DL)" hoặc "(±)" là viết tắt của raxemic hóa.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, cấu hình tuyệt đối của nguyên tử cacbon không đối xứng được biểu diễn bằng liên kết nét đậm hình nêm () và liên kết nét đứt hình nêm (), và cấu hình tương đối của nguyên tử cacbon không đối xứng được biểu diễn bằng liên kết nét đậm thẳng () và liên kết nét đứt thẳng (). Đường lượn sóng () biểu diễn liên kết nét đậm hình nêm () hoặc liên kết nét đứt hình nêm (), hoặc đường lượn sóng () biểu diễn liên kết nét đậm thẳng () và liên kết nét đứt thẳng ().

Các hợp chất được bộc lộ ở đây có thể có mặt ở dạng cụ thể. Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "tautome" hoặc "dạng tautome" có nghĩa là các chất đồng phân nhóm chức khác nhau ở trạng thái cân bằng động ở nhiệt độ trong phòng và có thể biến đổi lẫn nhau nhanh chóng. Nếu các tautome là có thể có (ví dụ, trong dung dịch), sự cân bằng hóa học của các tautome này có thể đạt được. Ví dụ, tautome proton, còn được gọi là tautome hướng proton, bao gồm sự chuyển hóa lẫn nhau bằng cách chuyển proton, như đồng phân hóa keto-enol và đồng phân hóa imin-enamin. Chất đồng phân hóa trị bao gồm sự chuyển hóa lẫn nhau bằng cách tái tổ hợp một số electron liên kết. Ví dụ cụ thể về sự tautome hóa keto-enol là sự chuyển hóa lẫn nhau giữa các tautome pentan-2,4-dion và 4-hydroxypent-3-en-2-on.

Thuật ngữ "chất đồng phân" được mô tả ở đây bao gồm các chất đồng phân lập thể, các chất đồng phân cis-trans, và các tautome.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "được làm giàu một chất đồng phân", "được làm giàu chất đồng phân", "được làm giàu một chất đồng phân đối ảnh", hoặc "được làm giàu chất đồng phân đối ảnh" có nghĩa là hàm lượng của một trong số các chất đồng phân hoặc các chất đồng phân đối ảnh này là nhỏ hơn 100% và lớn hơn hoặc bằng 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, hoặc 99,9%.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "lượng dư chất đồng phân" hoặc "lượng dư chất đồng phân đối ảnh" để chỉ hiệu số giữa các tỷ lệ phần trăm tương đối của

hai chất đồng phân hoặc chất đồng phân đối ảnh. Ví dụ, nếu hàm lượng của một chất đồng phân hoặc chất đồng phân đối ảnh là 90% và hàm lượng của chất đồng phân hoặc chất đồng phân đối ảnh còn lại là 10%, lượng dư chất đồng phân hoặc chất đồng phân đối ảnh (chỉ số ee) là 80%.

Các chất đồng phân quay quang (*R*) và (*S*), hoặc các chất đồng phân *D* và *L* có thể được điều chế bằng cách tổng hợp không đối xứng hoặc các chất phản ứng không đối xứng hoặc các kỹ thuật thông thường khác. Nếu một loại chất đồng phân đối ảnh của hợp chất nhất định được bộc lộ ở đây cần thu được, chất đồng phân đối ảnh tinh khiết mong muốn có thể được điều chế bằng cách tổng hợp không đối xứng hoặc tạo dẫn xuất bằng cách sử dụng chất phụ trợ không đối xứng, trong đó hỗn hợp chất đồng phân không đối quang tạo ra được tách và nhóm phụ trợ được phân cắt. Theo cách khác, khi phân tử chứa nhóm chức bazơ (như amino) hoặc nhóm chức axit (như carboxyl), hợp chất này phản ứng với axit hoặc bazơ quay quang thích hợp để tạo thành muối của chất đồng phân không đối quang, sau đó, chất này được phân giải chất đồng phân không đối quang bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này để thu được chất đồng phân đối ảnh tinh khiết. Ngoài ra, chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang thường được tách bằng cách sắc ký sử dụng pha tĩnh không đối xứng, tùy ý kết hợp với tạo dẫn xuất hóa học (ví dụ, carbamat được tạo ra từ amin).

Hợp chất được bộc lộ ở đây có thể chứa tỷ lệ không có trong tự nhiên của đồng vị nguyên tử ở một hoặc nhiều nguyên tử tạo thành hợp chất. Ví dụ, hợp chất có thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, như triti (^3H), iot-125 (^{125}I), hoặc C-14 (^{14}C). Theo một ví dụ khác, hydro có thể được thế bằng đơteri để tạo thành dược chất được đơteri hóa, và liên kết được tạo bởi đơteri và cacbon là bền vững hơn so với liên kết được tạo bởi hydro và cacbon thông thường. So với dược chất không được đơteri hóa, dược chất được đơteri hóa có ưu điểm là tác dụng phụ gây độc giảm, độ ổn định tăng, hiệu quả tăng, thời gian bán hủy sinh học kéo dài và tương tự. Tất cả các biến thể đồng vị của hợp chất được mô tả ở đây, bất kể là có hoạt tính phóng xạ hay không, được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. "Tùy ý" hoặc "theo cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả sau đó có thể, nhưng không nhất thiết, xảy ra, và phần mô tả bao gồm các trường hợp trong đó sự kiện hoặc tình huống này xảy ra và các trường hợp trong đó nó không xảy ra.

Thuật ngữ "được thế" có nghĩa là một hoặc nhiều nguyên tử hydro trên nguyên tử cụ thể được thế bằng (các) nhóm thế chúng có thể bao gồm các biến thể đơteri và hydro, miễn

là hóa trị của nguyên tử cụ thể là bình thường và hợp chất được thể là ổn định. Khi nhóm thể là oxy (tức là, =O), điều này có nghĩa là hai nguyên tử hydro được thể. Sự thể bằng oxy không xảy ra trên các nhóm thơm. Thuật ngữ "được thể tùy ý" có nghĩa là một nguyên tử có thể được thể hoặc không được thể bằng nhóm thể. Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, loại và số lượng nhóm thể có thể là tùy ý miễn là có thể đạt được về mặt hóa học.

Khi biến số bất kỳ (ví dụ, R) xuất hiện nhiều hơn một lần trong cấu tạo hoặc cấu trúc của hợp chất, định nghĩa của biến số này trong mỗi trường hợp là độc lập. Do đó, ví dụ, nếu một nhóm được thể bằng 0 đến 2 nhóm R, nhóm này có thể được thể tùy ý bằng nhiều nhất hai nhóm R, và định nghĩa của R trong mỗi trường hợp là độc lập. Ngoài ra, tổ hợp của nhóm thể và/hoặc biến thể của nó là được phép chỉ khi tổ hợp này có thể tạo ra hợp chất ổn định.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "C₁₋₆ alkyl" để chỉ nhóm hydrocacbon no mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Nhóm C₁₋₆ alkyl này bao gồm C₁₋₄, C₁₋₃, C₁₋₂, C₂₋₆, C₂₋₄, C₆, C₅ alkyl và tương tự; nhóm này có thể là nhóm hóa trị một (ví dụ, metyl), hóa trị hai (ví dụ, metylen) hoặc đa hóa trị (ví dụ, metenyl). Các ví dụ về C₁₋₆ alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl (Me), etyl (Et), propyl (bao gồm *n*-propyl và isopropyl), butyl (bao gồm *n*-butyl, isobutyl, *s*-butyl, và *t*-butyl), pentyl (bao gồm *n*-pentyl, isopentyl, và neopentyl), hexyl, và tương tự.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, "C₃₋₆ xycloalkyl" để chỉ nhóm hydrocacbon vòng no bao gồm 3 đến 6 nguyên tử cacbon, bao gồm các hệ vòng có một vòng và hai vòng. Nhóm C₃₋₆ xycloalkyl này bao gồm C₃₋₅ xycloalkyl, C₄₋₅ xycloalkyl, C₅₋₆ xycloalkyl và tương tự, và có thể là nhóm hóa trị một, hóa trị hai hoặc đa hóa trị. Các ví dụ về C₃₋₆ xycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl và tương tự.

Thuật ngữ "được phẩm" để chỉ hỗn hợp bao gồm một hoặc nhiều hợp chất hoặc muối được dụng của nó được bộc lộ ở đây và tá được dụng. Được phẩm này được dự định để tạo thuận lợi cho việc sử dụng hợp chất cho thực thể hữu cơ.

Thuật ngữ "các tá được dụng" để chỉ các chất không có tác dụng kích ứng đáng kể đối với thực thể hữu cơ và không làm giảm hoạt tính sinh học và các đặc tính của hoạt chất. Các tá được thích hợp là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, như hydratecacbon, sáp, polyme tan trong nước và/hoặc có thể trương trong nước, chất ưa nước hoặc kỵ nước, gelatin, dầu, dung môi, và nước.

Thuật ngữ "điều trị" có nghĩa là sử dụng hợp chất hoặc chế phẩm được mô tả ở đây để cải thiện hoặc loại bỏ bệnh hoặc một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh này, và bao gồm:

- (i) ức chế bệnh hoặc tình trạng bệnh, tức là làm ngừng sự phát triển của nó; và
- (ii) làm giảm nhẹ bệnh hoặc tình trạng bệnh, tức là làm thoái triển bệnh.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu điều trị" để chỉ lượng của hợp chất được bộc lộ ở đây để (i) điều trị bệnh, tình trạng, hoặc rối loạn cụ thể, hoặc (ii) làm giảm nhẹ, cải thiện, hoặc loại trừ một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, tình trạng, hoặc rối loạn cụ thể. Lượng của hợp chất được bộc lộ ở đây tạo thành "lượng hữu hiệu điều trị" thay đổi phụ thuộc vào hợp chất, tình trạng bệnh và mức độ nặng của nó, chế độ sử dụng, và tuổi của động vật có vú cần điều trị, nhưng có thể được xác định theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này theo sự hiểu biết của họ và bản mô tả này.

Thuật ngữ "phòng ngừa" có nghĩa là sử dụng hợp chất hoặc chế phẩm được mô tả ở đây để phòng ngừa bệnh hoặc một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh này, và bao gồm: phòng ngừa sự xuất hiện của bệnh hoặc tình trạng bệnh ở động vật có vú, cụ thể là khi động vật có vú này có khả năng mắc tình trạng bệnh nhưng vẫn chưa được chẩn đoán là có tình trạng này.

Các chữ viết tắt sau đây được sử dụng trong sáng chế:

Pd/C	Chất xúc tác Pd/C, chứa 10% trọng lượng paladi
DCM	Diclometan
THF	Tetrahydrofuran
Boc	<i>Tert</i> -butyloxycarbonyl, nhóm bảo vệ amin
Cbz	Benzyloxycarbonyl, nhóm bảo vệ amin
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamit
TFA	Axit trifloaxetic
PE	Ete dầu mỏ
DMSO	Dimetyl sulfoxit
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
HOAc	Axit axetic
Trt	Triphenylmetyl

CbzCl	Benzyl cloformat
DIPEA	Diisopropyletylamin
SiO ₂	Bột silicagel qua rây 100-200, dùng cho sắc ký cột
psi	Pao lực/ inơ vuông, đơn vị đo áp suất
<i>p</i> -HPLC	Sắc ký chất lỏng tính năng cao điều chế (preparative high performance liquid chromatography) để tinh chế các hợp chất

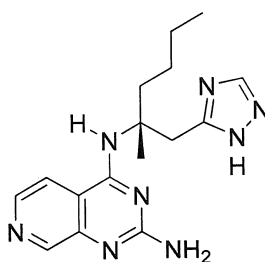
Các dung môi được sử dụng ở đây là có bán trên thị trường và không cần tinh chế thêm. Phản ứng thường được thực hiện trong dung môi khan dưới môi trường nitơ. Dữ liệu cộng hưởng từ hạt nhân proton được ghi trên phổ kế Bruker Avance III 400 (400 MHz) và độ dịch chuyển hóa học được ghi dưới dạng ppm xuôi trường so với tetrametylsilan. Phổ khối được xác định trên Agilent 1200 series plus 6110 (&1956A). LC/MS hoặc Shimadzu MS bao gồm DAD: SPD-M20A (LC) và bộ phát hiện Shimadzu Micromass 2020. Phổ khối kế được lắp nguồn ion phun electron (electrospray ionsource, ESI) hoạt động theo chế độ dương hoặc âm.

Hệ thống Shimadzu LC20AB lắp với bộ phận lấy mẫu tự động Shimadzu SIL-20A và bộ phát hiện Shimadzu DAD: SPD-M20A được sử dụng để phân tích sắc ký chất lỏng tính năng cao bằng cột sắc ký Xtimate C18 (chất nạp 3m, đặc tính kỹ thuật: 2,1 × 300mm).

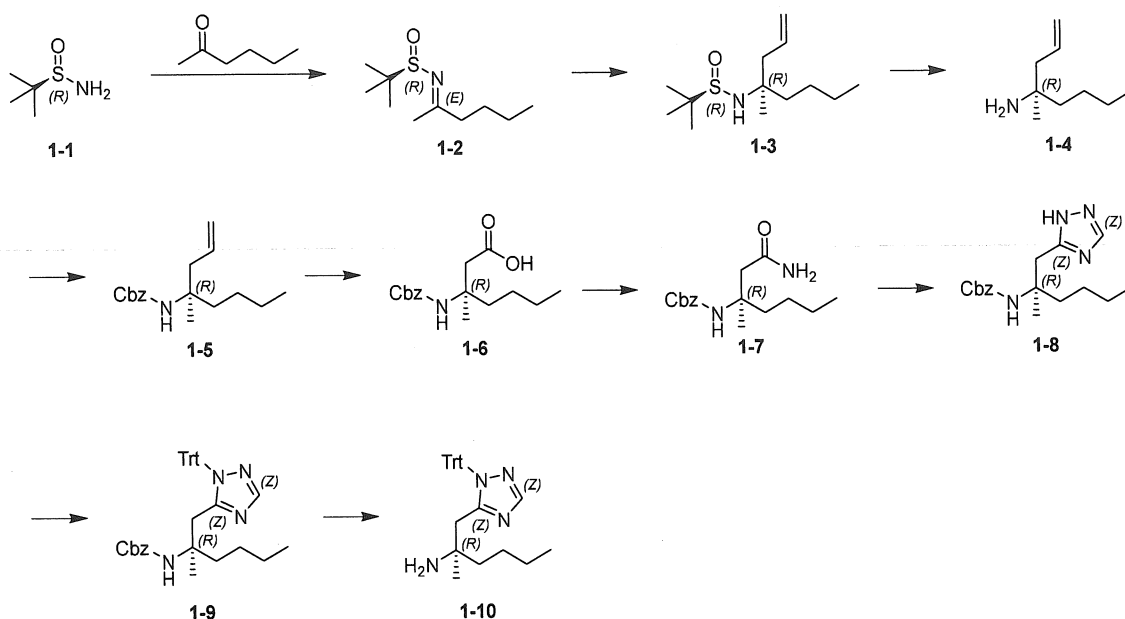
Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây bằng các ví dụ. Tuy nhiên, điều này không có nghĩa là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất lợi. Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết ở đây và các ví dụ cụ thể cũng đã được bộc lộ, sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này là các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được thực hiện đối với các phương án cụ thể mà không đi chệch khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1



Điều chế hợp chất trung gian 1-10:



Bước A: hợp chất 1-1 (50g, 412,54mmol) và tetraethyl titanat (94,10g, 412,54mmol, 85,55ml) được hòa tan trong THF (500ml) ở 20-30°C, và dung dịch này được bổ sung 2-hexanon (41,32g, 412,54mmol, 51,01ml). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm tới 65°C và khuấy trong 48 giờ, và hỗn hợp phản ứng tạo ra được sử dụng ngay trong bước tiếp theo.

Bước B: hỗn hợp phản ứng trong bước A được làm nguội tới nhiệt độ trong phòng, bổ sung THF (1000ml), sau đó bổ sung allyl bromua (196,33g, 1,62mol), và bổ sung chậm bột kẽm (53,06g, 811,43mmol) theo nhiều phần. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C trong 12 giờ dưới môi trường nitơ. Hỗn hợp phản ứng được lọc bằng diatomit, và nước lọc được bổ sung nước muối bão hòa (100ml), khuấy, và lọc bằng diatomit. Nước lọc tạo ra được làm khô bằng thiết bị làm bay hơi kiểu quay. Phần cặn được hòa tan trong ethyl axetat (100ml). Pha hữu cơ tách ra được rửa bằng nước muối bão hòa (300ml × 1), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (SiO₂, PE/EtOAc = 15/1 đến 5/1) để thu được hợp chất 1-3. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5,96 - 5,75 (m, 1H), 5,23 - 5,08 (m, 2H), 3,20 (s, 1H), 2,39 - 2,20 (m, 2H), 1,74 (br s, 1H), 1,56 - 1,42 (m, 2H), 1,40 - 1,15 (m, 14H), 0,96 - 0,86 (m, 3H).

Bước C: hợp chất 1-3 (15g, 61,12mmol) được hòa tan trong metanol (150ml), và dung dịch này được làm lạnh tới 0°C và bổ sung chậm dung dịch dioxan chứa axit clohydric (4M, 91,68ml) ở 0-20°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được cô ngay dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất 1-4.

Bước D: hợp chất 1-4 (hydroclorua, 13g, 73,15mmol) và natri bicarbonat (55,31g, 658,36mmol) được hòa tan trong dioxan (90ml) và H₂O (60ml), và dung dịch này được

làm lạnh tới 0°C và sau đó bổ sung nhỏ giọt chậm CbzCl (74,87g, 438,91mmol, 62,40ml). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm tới 20-30°C, khuấy trong 2 giờ, và chiết bằng ethyl axetat (100ml × 2). Các pha hữu cơ được kết hợp, rửa bằng nước muối bão hòa (150ml × 1), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (SiO₂, PE/EtOAc = 1/0 đến 100/1) để tạo ra hợp chất 1-5. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,30 - 7,26 (m, 5H), 5,76 - 5,62 (m, 1H), 5,08 - 4,91 (m, 4H), 2,47 - 2,34 (m, 1H), 2,32 - 2,20 (m, 1H), 1,72 - 1,57 (m, 1H), 1,50 - 1,42 (m, 1H), 1,30 - 1,10 (m, 7H), 0,76 - 0,76 (m, 1H), 0,76 - 0,76 (m, 1H), 0,82 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H).

Bước E: hợp chất 1-5 (20,8g, 75,53mmol) được hòa tan trong axetonitril (100ml), H₂O (150ml) và cacbon tetrachlorua (100ml), và dung dịch này được làm lạnh tới 0°C và bổ sung chậm natri periodat (64,62g, 302,12mmol), sau đó bổ sung ruteni trichlorua trihydrat (394,99mg, 1,51mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm tới 25°C và khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc bằng diatomit và chiết bằng DCM (200ml × 1). Pha hữu cơ được rửa lần lượt bằng dung dịch natri sulfit bão hòa trong nước (200ml × 1) và nước muối bão hòa (200ml × 1), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất thô 1-6, hợp chất này được sử dụng ngay trong bước tiếp theo. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,40 - 7,35 (m, 5H), 5,19 (s, 1H), 5,08 (s, 2H), 2,89 (br d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 2,69 (br d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 1,90 - 1,77 (m, 1H), 1,74 - 1,62 (m, 1H), 1,43 - 1,20 (m, 7H), 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

Bước F: hợp chất 1-6 (20g, 68,18mmol) và triethylamin (10,35g, 102,26mmol, 14,23ml) được hòa tan trong THF (250ml), và dung dịch này được bổ sung nhỏ giọt isobutyl cloformat (9,78g, 71,59mmol, 9,40ml) ở -10°C dưới môi trường nitơ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10 đến 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được bổ sung chậm nước amoniac (63,70g, 454,41mmol, 70ml, 25%) và khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 5°C trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được cô dưới áp suất giảm và chiết bằng ethyl axetat (200ml × 1). Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối bão hòa (100ml × 2), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (SiO₂, PE/EtOAc = 10/1 đến 1/1) để tạo ra hợp chất 1-7. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,41 - 7,28 (m, 5H), 5,62 (br s, 1H), 5,30 - 5,12 (m, 2H), 5,11 - 5,01 (m, 2H), 2,76 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 2,44 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H), 1,85 - 1,74 (m, 1H), 1,73 - 1,62 (m, 3H), 1,39 - 1,29 (m, 5H), 0,90 (t,

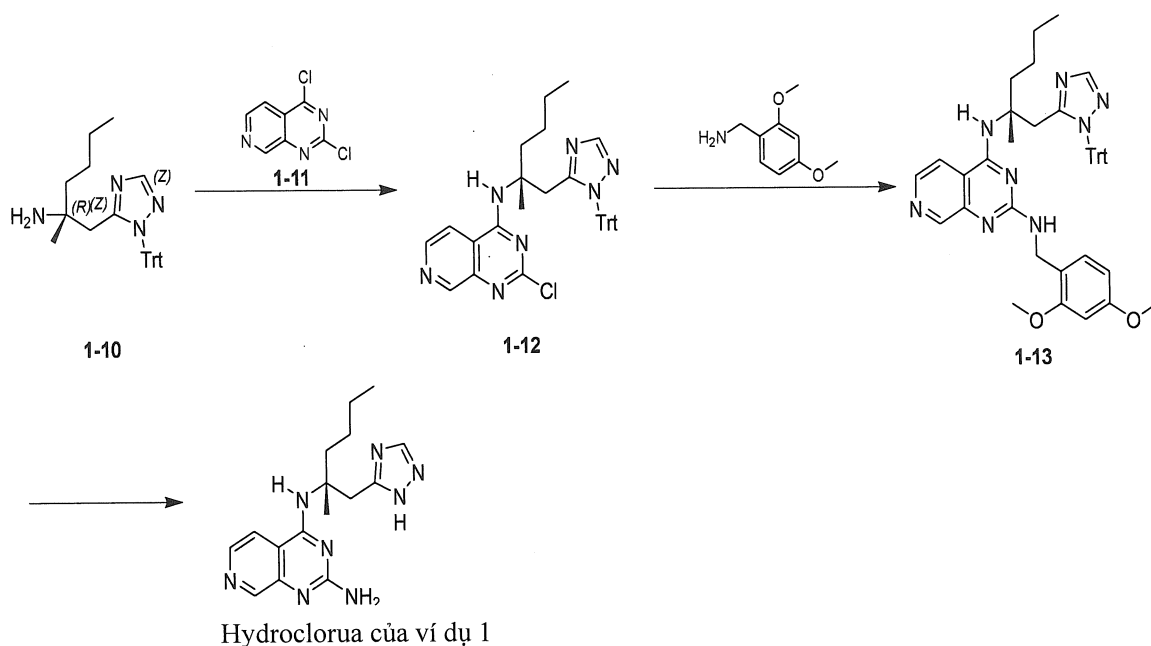
$J = 7,0$ Hz, 3H). LCMS (ESI) m/z : 293,3 $[M+H]^+$.

Bước G: hợp chất 1-7 (15,34g, 52,47mmol) và *N,N*-dimethylformamid dimetyl axetal (134,55g, 1,13mol, 150ml) được khuấy ở 120°C trong 2 giờ, cô dưới áp suất giảm, và hòa tan trong axit axetic (250ml), và dung dịch này được bổ sung chậm hydrazin hydrat (25,75g, 504,09mmol, 25ml, 98%). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 90°C trong 2 giờ dưới môi trường nitơ. Hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm, bổ sung H_2O (400ml), và chiết bằng DCM ($200\text{ml} \times 2$). Các pha hữu cơ được kết hợp, rửa bằng nước muối bão hòa ($200\text{ml} \times 2$), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất thô 1-8. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,95 (s, 1H), 7,43 - 7,29 (m, 5H), 5,08 (s, 2H), 4,90 (br s, 1H), 3,42 (br d, $J = 13,9$ Hz, 1H), 3,12 (d, $J = 14,3$ Hz, 1H), 1,87 - 1,77 (m, 1H), 1,68 - 1,58 (m, 1H), 1,41 - 1,17 (m, 7H), 0,90 (br t, $J = 6,5$ Hz, 3H). LCMS (ESI) m/z : 317,2 $[M+H]^+$.

Bước H: hợp chất 1-8 (15,20g, 48,04mmol) và DIPEA (12,42g, 96,08mmol, 16,74ml) được hòa tan trong DCM (160ml), và dung dịch này được bổ sung chậm triphenylclometan (20,09g, 72,06mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung H_2O (100ml), bổ sung dung dịch axit clohydric loãng 2N để điều chỉnh độ pH (7-8), và chiết bằng DCM ($100\text{ml} \times 1$). Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối bão hòa ($100\text{ml} \times 2$), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (SiO_2 , PE/EtOAc = 20/1 đến 5/1) để tạo ra hợp chất 1-9. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,89 (s, 1H), 7,37 - 7,27 (m, 14H), 7,18 - 7,07 (m, 6H), 5,72 (br s, 1H), 5,16 - 4,93 (m, 2H), 3,07 (d, $J = 14,2$ Hz, 1H), 2,90 (d, $J = 14,2$ Hz, 1H), 1,80 - 1,61 (m, 4H), 1,33 (s, 3H), 0,90 - 0,84 (m, 3H). LCMS (ESI) m/z : 559,3 $[M+H]^+$.

Bước I: hợp chất 1-9 (12,75g, 22,82mmol) được hòa tan trong isopropanol (300ml), và dung dịch này được bổ sung Pd/C (6g) dưới môi trường nitơ. Huyền phù này được loại khí trong chân không và thổi hydro ba lần, và khuấy ở 25°C trong 16 giờ trong môi trường hydro (15 psi, 103,5 kPa). Hỗn hợp phản ứng được lọc bằng diatomit và rửa bằng DCM (300ml), và nước lọc được cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất 1-10. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,91 (s, 1H), 7,37 - 7,28 (m, 9H), 7,17 - 7,11 (m, 6H), 2,87 (s, 2H), 1,45 - 1,24 (m, 6H), 1,12 (s, 3H), 0,92 - 0,84 (m, 3H). LCMS (ESI) m/z : 425,2 $[M+H]^+$.

Tổng hợp hợp chất của Ví dụ 1:



Bước A: hợp chất 1-10 (1,91g, 4,50mmol) và hợp chất 1-11 (900mg, 4,50mmol) được hòa tan trong THF (9ml), và dung dịch này được bổ sung DIPEA (9,00mmol, 1,57ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 70°C trong 3 giờ dưới môi trường nitơ. Hỗn hợp phản ứng này được cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất thô 1-12. LCMS (ESI) m/z : 588,42 $[M+H]^+$.

Bước B: hợp chất thô 1-12 (3,60g, 6,12mmol) và 2,4-dimethoxybenzylamin (3,01mg, 18,00mmol, 2,71ml) được hòa tan trong 1,4-dioxan (30ml), và dung dịch này được bổ sung DIPEA (8,99mmol, 1,57ml) dưới môi trường nitơ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 100°C trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được bổ sung nước (20ml) và etyl axetat (50ml) để tách chất lỏng. Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối bão hòa (20ml), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (SiO_2 , DCM/MeOH = 100/1 đến 15/1) để tạo ra hợp chất 1-13. LCMS (ESI) m/z : 719,7 $[M+H]^+$.

Bước C: hợp chất 1-13 (2,00g, 2,78mmol) và triethylsilan (970,50mg, 8,35mmol, 1,33ml) được hòa tan trong TFA (41,81ml), và dung dịch này được khuấy ở 28°C trong 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô ngay dưới áp suất giảm và tinh chế bằng *p*-HPLC (cột: Phenomenex luna C18 250×50mm×10μm; chất lỏng: [nước (0,05% HCl)-axetonitril]; axetonitril %: 10%-40%, 28 phút, 50% phút) để tạo ra hydroclorua của ví dụ 1. 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 9,15 (s, 1H), 8,90 (s, 1H), 8,59 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 8,26 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 4,11 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 3,53 (d, J = 14,9 Hz, 1H), 2,60 (dt, J = 4,1, 12,8 Hz,

1H), 1,79 (dt, $J = 4,2, 12,8$ Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,52 - 1,19 (m, 4H), 0,92 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H). LCMS (ESI) m/z : 327,1 $[M+H]^+$.

Ví dụ thử nghiệm 1: Sàng lọc ái lực liên kết thụ thể *In Vitro* của thụ thể giống Toll 7 (TLR7) của người và thụ thể giống Toll 8 (TLR8) của người

Các dòng tế bào HEK-Blue™ hTLR7 (mã sản phẩm trong catalog: hkb-htlr7) và HEK-Blue™ hTLR8 (mã sản phẩm trong catalog: hkb-htlr8) sử dụng trong thử nghiệm này được mua của InvivoGen. Hai dòng tế bào này được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm ổn định hTLR7 hoặc hTLR8 vào dòng tế bào thận phôi người 293 và cảm ứng sự biểu hiện của gen thông báo phosphatase kiềm được tiết ra (Secreted Alkaline Phosphatase, SEAP), trong đó gen thông báo SEAP được điều hòa bằng gen khởi đầu IFN- β . Gen khởi đầu này được dung hợp với các vị trí liên kết NF- κ B và AP-1. Chất chủ vận hTLR7 hoặc hTLR8 có thể hoạt hóa NF- κ B và AP-1 và cảm ứng sự biểu hiện và tiết SEAP. Hoạt tính chủ vận của hợp chất đối với thụ thể hTLR7 và hTLR8 được xác định bằng cách đo mức biểu hiện của SEAP bằng cách sử dụng chất phản ứng QUANTI-Blue™.

Các quy trình thử nghiệm là như sau:

1. Hợp chất được bổ sung vào đĩa tế bào theo gradien 3 lần, với các nồng độ cuối lần lượt là 5000nM, 1667nM, 556nM, 185nM, 62nM, 21nM, 6,9nM, 2,3nM, 0,76nM và 0,25nM, và hai lỗ giống nhau được tạo ra đối với mỗi nồng độ. 1 μ l DMSO được bổ sung vào mỗi lỗ đối chứng âm.

2. Các tế bào được nuôi cấy trong bình T150 được lấy ra khỏi tủ áp CO₂, và dịch nổi bề mặt nuôi cấy tế bào được loại bỏ. Tế bào thu được được rửa một lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat Dulbecco (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS). Bình này được bổ sung khoảng 10ml môi trường nuôi cấy, và gõ nhẹ để làm bong tế bào. Khối tế bào tạo ra được hút nhẹ bằng pipet đều đặn. Các tế bào được đếm và hỗn dịch tế bào được điều chỉnh tới 500.000 tế bào/ml bằng môi trường nuôi cấy. Sau đó 100 μ l tế bào đã pha loãng (50.000 tế bào/lỗ) được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ chứa hợp chất.

3. Hợp chất và các tế bào được ủ trong tủ áp ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ.

4. Thử nghiệm hoạt tính của hợp chất: 20 μ l dịch nổi bề mặt tế bào đã cảm ứng của mỗi lỗ được bổ sung vào đĩa nuôi cấy tế bào chứa 180 μ l chất phản ứng QUANTI-Blue™, và sau khi ủ ở 37°C trong 1 giờ, năng suất hấp thụ theo mật độ quang ở 650nM (OD₆₅₀) được phân tích đối với mỗi lỗ bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa đa chức năng.

5. Thử nghiệm hoạt tính đối với tế bào: tín hiệu luxiferaza (RLU) được phát hiện bằng

cách sử dụng máy đọc vi đĩa đa chức năng theo quy trình được mô tả trong các hướng dẫn của ATPlite 1Step.

6. Phân tích dữ liệu: hoạt tính của hợp chất: các giá trị OD₆₅₀ được phân tích bằng cách sử dụng chương trình phần mềm GraphPad Prism và các đường cong đáp ứng-liều của hợp chất được làm khớp để tính các giá trị EC₅₀ (nồng độ tác dụng nửa tối đa) của hợp chất.

Các kết quả thử nghiệm: các kết quả này được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

Hợp chất thử nghiệm	TLR8 của người EC ₅₀ (μM)	TLR7 của người EC ₅₀ (μM)
Hydroclorua của ví dụ 1	0,003	33,33

Kết luận: hợp chất được bộc lộ ở đây có hoạt tính chủ vận TLR8 mong muốn và, liên quan đến TLR8 và TLR7, có tính chọn lọc đặc hiệu đối với TLR8.

Ví dụ thử nghiệm 2: Quy trình thử nghiệm đối với tế bào đơn nhân máu ngoại vi

TLR8 là thụ thể của hệ miễn dịch bẩm sinh để nhận biết các thể gây bệnh ngoại bào, và có thể nhận biết ARN sợi đơn của virus ngoại bào và gây ra sự giải phóng một loạt các xytokin như TNF-α, IL-12, IFN-γ để tạo ra phản ứng miễn dịch kháng virus; TLR7 là một thụ thể khác của hệ miễn dịch bẩm sinh để nhận biết các thể gây bệnh ngoại sinh và, khi được hoạt hóa, chủ yếu tạo ra các xytokin kháng virus như IFN-α. Trong thử nghiệm này, hợp chất tiềm năng của chất chủ vận TLR8 được sử dụng để kích thích các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (human peripheral blood mononuclear cell, hPBMC), và mức TNF-α, IL-12p40, IFN-γ và IFN-α ở trên được xác định để cho biết tác dụng hoạt hóa của hợp chất đối với thụ thể TLR8 và tính chọn lọc của nó đối với TLR8/TLR7.

Các quy trình thử nghiệm là như sau:

1. Máu tươi của các tình nguyện viên khỏe mạnh được thu thập, và chống đông bằng ống chống đông EDTA-K2 (mã sản phẩm trong catalog: BD-8516542);

2. Các tế bào hPBMC trong lớp giữa giống như đám mây được tách ra sau khi ly tâm gradien tỷ trọng Ficoll, và rửa hai lần bằng RPMI1640 (nguồn: Gibco, mã sản phẩm trong catalog: 224400-089) chứa 10% huyết thanh, và môi trường nuôi cấy được tái tạo huyền phù thành 10ml. Sau khi các tế bào được đếm bằng máy đếm tế bào Vi-cell, nồng độ của hỗn dịch tế bào được điều chỉnh tới 2×10^6 /ml;

3. Hợp chất được hòa tan trong DMSO tới 100mM, và pha loãng tới 50mM và 2mM

bằng DMSO, chúng được dùng làm các nồng độ ban đầu. Sau đó mỗi dung dịch được pha loãng liên tiếp theo gradien 3 lần (mẫu ở nồng độ trước đó (5 μ l) + DMSO (10 μ l)) để thu được 8 gradien. Các dung dịch thu được lần lượt được pha loãng 500 lần bằng môi trường nuôi cấy để điều chế các dung dịch làm việc của hợp chất;

4. 100 μ l hỗn dịch hPBMC và 100 μ l dung dịch làm việc của hợp chất được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ có đáy hình chữ U, với các nồng độ cuối lần lượt là 2000nM, 666,7nM, 222,2nM, 74,1nM, 24,7nM, 8,2nM, 2,7nM và 0,9nM, và ủ trong 24 giờ. Sau đó, các dịch nổi bề mặt được thu hồi và bảo quản lạnh ở -20°C để phát hiện các xytokin TNF- α , IFN- γ và IL-12p40. Nhóm khác của các mẫu hợp chất, với các nồng độ cuối lần lượt là 50 μ M, 16,7 μ M, 5,6 μ M, 1,9 μ M, 0,6 μ M, 0,2 μ M, 0,1 μ M và 0,02 μ M, được ủ trong 24 giờ. Các dịch nổi bề mặt được thu hồi và bảo quản lạnh ở -20°C để phát hiện các xytokin IFN- α ;

5. IL-12p40, TNF- α và IFN- γ trong dịch nổi bề mặt được phát hiện bằng mảng hạt đếm tế bào (cytometric bead array, CBA) theo dòng; IFN- α trong dịch nổi bề mặt tế bào được phát hiện bằng thử nghiệm chất hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA).

6. Phân tích dữ liệu: hoạt tính của hợp chất: giá trị EC₅₀ (nồng độ tác dụng nửa tối đa) được phân tích bằng cách sử dụng chương trình phần mềm GraphPad Prism và các đường cong đáp ứng-liều của hợp chất được làm khớp để tính giá trị EC₅₀ của hợp chất.

Các kết quả thử nghiệm: các kết quả này được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

Hợp chất thử nghiệm	IL-12p40 EC ₅₀ (nM)	IFN- γ EC ₅₀ (nM)	TNF- α EC ₅₀ (nM)	IFN- α EC ₅₀ (nM)
Hydroclorua của ví dụ 1	26	29	105	2800

Kết luận: hợp chất được bộc lộ ở đây có hoạt tính cảm ứng mong muốn đối với các xytokin đặc hiệu của con đường TLR8 là IL-12p40, TNF- α và IFN- γ , và hoạt tính cảm ứng tương đối thấp đối với xytokin đặc hiệu của con đường TLR7 là IFN- α , cho thấy tính chọn lọc đặc hiệu mong muốn đối với sự hoạt hóa con đường TLR8.

Ví dụ thử nghiệm 3: Nghiên cứu dược động học ở chuột nhắt

Thử nghiệm này được dự định để đánh giá đặc tính dược động học của hợp chất sau một lần tiêm tĩnh mạch hoặc sử dụng trong dạ dày ở chuột nhắt. Tiêm tĩnh mạch: hợp chất thử nghiệm được điều chế thành dung dịch trong suốt 0,5mg/ml, bằng chất dẫn thuốc là

5% DMSO/5% polyetylen glycol-15 hydroxystearat/90% nước; sử dụng trong dạ dày: hợp chất thử nghiệm được điều chế thành hỗn dịch 2mg/ml, bằng chất dẫn thuốc là 0,5% natri carboxymetylxenluloza/0,2% tween 80/99,3% nước.

Nồng độ của hợp chất thử nghiệm trong huyết tương được xác định bằng sắc ký lỏng tính năng cao-phổ khối nối tiếp (LC-MS/MS). Thời gian lưu của hợp chất và chất chuẩn nội, việc thu nhận sắc ký đồ và tích phân sắc ký đồ được xử lý bằng cách sử dụng chương trình phần mềm Analyst (Applied Biosystems), và các kết quả thống kê dữ liệu được xử lý bằng cách sử dụng chương trình phần mềm Watson LIMS (Thermo Fisher Scientific) hoặc Analyst (Applied Biosystems).

Các nồng độ trong huyết tương được xử lý bằng cách sử dụng mô hình không chia khoang WinNonlin™ phiên bản 6.3 (Pharsight, Mountain View, CA), chương trình phần mềm được động học, và các tham số được động học được tính bằng cách sử dụng phương pháp hình thang log tuyến tính.

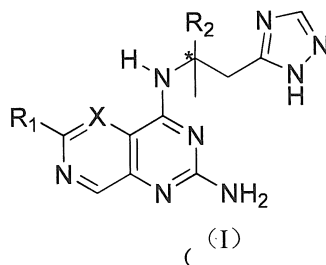
Các tham số được động học liên quan ở chuột nhắt ở liều 1mg/kg tiêm tĩnh mạch và 5mg/kg sử dụng qua đường miệng trong dạ dày của hydroclorua của ví dụ 1 được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Các tham số được động học liên quan ở chuột nhắt

Tiêm tĩnh mạch (1mg/kg)	Cl (ml/phút/kg)	90,2
	Vdss (l/kg)	1,75
	t _{1/2} (giờ)	0,25
	AUC _{0-cuối cùng} (nM. giờ)	450
Sử dụng qua đường miệng trong dạ dày (5mg/kg)	T _{max} (giờ)	0,5
	C _{max} (nM)	421
	AUC _{0-cuối cùng} (nM. giờ)	624
Độ sinh khả dụng (F%)		27,7

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I), chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó,



trong đó,

nguyên tử cacbon có dấu "*" có thể là nguyên tử cacbon không đối xứng có mặt ở dạng chất đồng phân đối ảnh đơn (*R*) hoặc (*S*) hoặc ở dạng được làm giàu bằng một chất đồng phân đối ảnh;

X là CH;

R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, CN, và C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ alkyl tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_d;

R₂ được chọn từ nhóm bao gồm , và , và tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_e;

mỗi nhóm R_d và R_e độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, OH, CN, và NH₂.

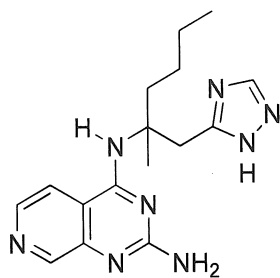
2. Hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó mỗi nhóm R_d và R_e độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, và OH.

3. Hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, và CH₃, CH₃ tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nhóm R_d.

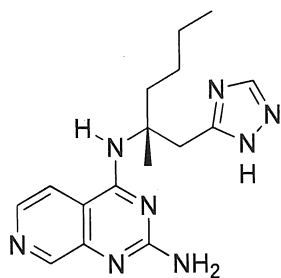
4. Hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R₁ được chọn từ nhóm bao gồm H, F, Cl, Br, I, và CH₃.

5. Hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó R₂ là .

6. Hợp chất có công thức dưới đây, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó:



7. Hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó theo điểm 6, được chọn từ



8. Dược phẩm chứa hợp chất, chất đồng phân của nó hoặc muối được dụng của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.