



(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) 
1-0020316

(51)⁷ **C07D 239/95, A61P 31/12, A61K**
31/505

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2015-01502 | (22) | 15.11.2013 | | |
| (86) | PCT/EP2013/073901 | 15.11.2013 | (87) | WO2014/076221 | 22.05.2014 |
| (30) | 12192970.7 | 16.11.2012 | EP | | |
| (45) | 25.01.2019 | 370 | (43) | 25.09.2015 | 330 |
| (73) | JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (IE)
Eastgate Village, Eastgate, Little Island, Co Cork, Ireland | | | | |
| (72) | LAST, Stefaan, Julien (BE), MC GOWAN, David, Craig (US), EMBRECHTS,
Werner (BE), PIETERS, Serge, Maria, Aloysius (NL), JONCKERS, Tim, Hugo,
Maria (BE), RABOISSON, Pierre, Jean-Marie, Bernard (FR) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | | | |
-

(54) **HỢP CHẤT 2-AMINO-QUINAZOLIN DỊ VÒNG ĐƯỢC THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH NHIỄM VIRUT**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất 2-amino-quinazolin dị vòng được thể, quy trình điều chế và dược phẩm chứa hợp chất này, để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virut.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất 2-amino-quinazolin dị vòng được thể, quy trình điều chế và được phẩm chứa hợp chất này, để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virus.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến việc sử dụng các hợp chất 2-amino-quinazolin dị vòng được thể trong điều trị các bệnh nhiễm virus, các rối loạn miễn dịch hoặc viêm, trong đó có liên quan đến quá trình điều biến, hoặc chủ vận, các thụ thể giống Toll (TLR: toll-like receptor). Các thụ thể giống Toll là các protein xuyên màng sơ cấp được đặc trưng bởi miền ngoại bào giàu leuxin và phần mở rộng tế bào chất chứa vùng bảo toàn. Hệ miễn dịch bẩm sinh có thể nhận biết các kiểu mẫu phân tử gắn liền với mầm bệnh thông qua các TLR được biểu hiện trên bề mặt tế bào của một số loại tế bào miễn dịch nhất định. Việc nhận biết các mầm bệnh lạ kích hoạt quá trình sản xuất các cytokin và điều tiết tăng các phân tử đồng kích thích trên các tế bào thực bào. Điều này dẫn đến sự điều biến động thái của tế bào T.

Ước tính được rằng phần lớn các loài động vật có vú đều có từ mười đến mười lăm loại thụ thể giống Toll. Mười ba TLR (được đặt tên là TLR1 đến TLR13) đã được nhận diện ở người và chuột nhắt, và các dạng tương đương của nhiều loại trong số chúng đã được phát hiện ở các loài động vật có vú khác. Tuy nhiên, các dạng tương đương của TLR nhất định mà được phát hiện ở người thì không có mặt ở tất cả các động vật có vú. Ví dụ, gen mã hóa cho protein tương tự với TLR10 ở người có mặt ở chuột nhắt, nhưng có vẻ như đã bị phá hủy tại một thời điểm nào đó trong quá khứ bởi retrovirus. Mặt khác, chuột nhắt biểu hiện các TLR 11, 12 và 13, không có loại nào trong số này được biểu hiện ở người. Các loài động vật có vú khác có thể biểu hiện các TLR mà không tìm thấy ở người. Các loài không phải động vật có vú khác có thể có các TLR khác biệt với các động vật có vú, minh chứng là TLR14, được phát hiện thấy ở cá xem sao Takifugu. Điều này có thể làm phức tạp quá trình sử dụng các động vật thí nghiệm làm mô hình về tính miễn dịch bẩm sinh ở người.

Phần mô tả chi tiết về các thụ thể giống Toll được mô tả trong các bài báo tạp chí sau đây: 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.

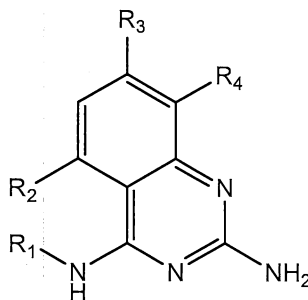
Các hợp chất thể hiện hoạt tính trên các thụ thể giống Toll đã được mô tả trước đó như các hợp chất purin trong WO 2006/117670, các hợp chất adenin trong WO 98/01448 và WO 99/28321, và các pyrimidin trong WO 2009/067081.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu lớn về các chất điều biến thụ thể giống Toll mới mà có tính chọn lọc ưu tiên, hiệu lực cao hơn, độ ổn định chuyển hóa cao hơn và profin độ an toàn cải thiện so với các hợp chất đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

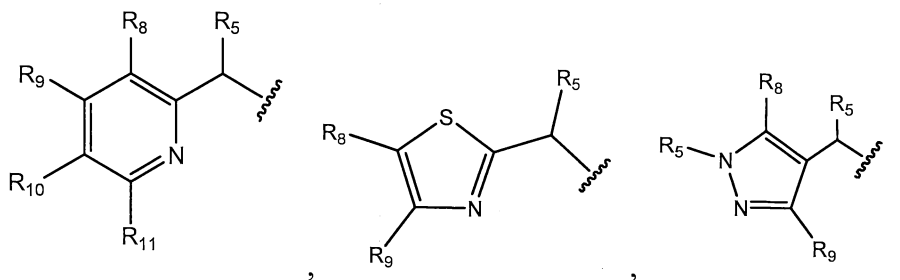
Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất 2-amino-quinazolin dị vòng được thể và dược phẩm chứa hợp chất này.

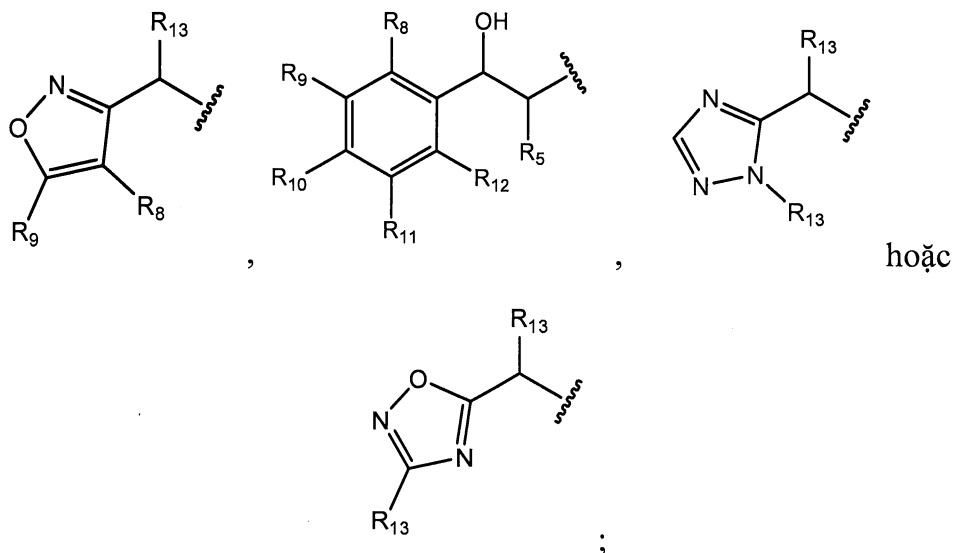
Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



hoặc muối, tautome, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của nó, trong đó:

R₁ có cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc nêu dưới đây:





R_2 là hydro, -O-(C_{1-3})-alkyl, halogen, (C_{1-3})-alkyl, -O-(C_{1-3})-alkyl-O-(C_{1-3})-alkyl hoặc CH_2OH ;

R_3 là hydro, -O-(C_{1-3})-alkyl, halogen, (C_{1-3})-alkyl hoặc $-C(=O)-R_7$ trong đó R_7 là -O-(C_{1-3})-alkyl, NH_2 , $NH(CH_3)$, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(C_{1-3})$ -alkyl, $N((C_{1-3})$ -alkyl) $_2$ hoặc pyrrolidin;

R_4 là hydro hoặc flo;

R_5 là (C_{1-3})-alkyl, (C_{1-3})-flo-alkyl hoặc CH_2OH ;

R_6 là NH_2 , $NH(CH_3)$ hoặc $N(CH_3)_2$, (hetero)-anilin được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} hoặc R_{12} hoặc (hetero)-benzylamin được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} hoặc R_{12} ,

mỗi nhóm R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} và R_{12} giống nhau hoặc khác nhau độc lập được chọn từ hydro, (C_{1-3})-alkyl, -O-(C_{1-3})-alkyl hoặc halogen,

và

R_{13} là hydro, (C_{1-3})-alkyl hoặc (C_{1-3})-flo-alkyl.

Các hợp chất được ưu tiên theo sáng chế là các hợp chất số 12 và 29 như được nêu trong bảng II.

Các hợp chất có công thức (I) và các muối, tautome, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc chất đa hình được dụng của chúng có hoạt tính để dùng làm dược chất, đặc biệt là làm chất điều biến hoạt tính thụ thể giống Toll (đặc biệt là hoạt tính TLR7 và/hoặc hoạt tính TLR8).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, tautome, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc chất đa hình được dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Ngoài ra, hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat, tautome, chất đồng phân lập thể hoặc chất đa hình được dụng của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat, tautome, chất đồng phân lập thể hoặc chất đa hình được dụng của nó có thể được sử dụng làm thuốc.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat, tautome, chất đồng phân lập thể hoặc chất đa hình được dụng của nó, hoặc được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat, tautome, chất đồng phân lập thể hoặc chất đa hình được dụng của nó có thể được sử dụng một cách phù hợp trong điều trị rối loạn trong đó có liên quan đến quá trình điều biến TLR7 và/hoặc TLR8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “(C₁₋₃)-alkyl” chỉ hydrocacbon béo no mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng có số lượng nguyên tử cacbon xác định.

Thuật ngữ “(C₁₋₃)-flo-alkyl” chỉ hydrocacbon béo no mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng có số lượng nguyên tử cacbon xác định trong đó một hoặc nhiều nguyên tử hydro được thay thế bằng nguyên tử flo.

Thuật ngữ “halogen” chỉ flo, clo, brom hoặc iot, tốt hơn là chỉ flo và clo.

Thuật ngữ “anilin” chỉ hợp chất có công thức C₆H₅NR₁₃- bao gồm nhóm phenyl được gắn vào nhóm amino; với “(hetero)-anilin” có nghĩa là 1 đến 3 nguyên tử nitơ, tốt hơn là 1 nguyên tử nitơ, có mặt trong vòng thơm.

Thuật ngữ “benzylamin” có nghĩa là hợp chất có công thức C₆H₅CH₂NR₁₃- bao gồm nhóm benzyl, C₆H₅CH₂, được gắn vào nhóm chức amin; với “(hetero)-benzylamin” có nghĩa là 1 đến 3 nguyên tử nitơ, tốt hơn là 1 nguyên tử nitơ, có mặt trong vòng thơm.

Trong bản mô tả này, công thức hóa học bất kỳ với các liên kết mà chỉ được thể hiện dưới dạng đường nét liền chứ không phải dưới dạng liên kết hình nêm nét liền hay liên kết hình nêm nét đứt, hoặc theo cách khác được thể hiện dưới dạng có cấu hình cụ

thể (ví dụ R , S) xung quanh một hoặc nhiều nguyên tử, sẽ bao gồm mọi chất đồng phân lập thể có thể có, hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất đồng phân lập thể.

Các thuật ngữ “chất đồng phân lập thể”, “dạng đồng phân lập thể” hoặc “chất đồng phân lập thể hóa học” trên đây hoặc dưới đây được sử dụng theo cách thay thế cho nhau.

Sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân lập thể của các hợp chất theo sáng chế dưới dạng chất đồng phân lập thể tinh khiết hoặc dưới dạng hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất đồng phân lập thể.

Các chất đồng phân đối ảnh là các chất đồng phân lập thể mà là các ảnh gương không thể đặt chồng khít lên nhau được của nhau. Hỗn hợp 1:1 của cặp chất đồng phân đối ảnh là hỗn hợp raxemat hoặc hỗn hợp raxemic.

Các chất đồng phân không đối quang (hoặc chất đồng phân phi đối hình) là các chất đồng phân lập thể mà không phải là chất đồng phân đối ảnh, tức là chúng không có liên quan theo góc độ là các ảnh gương. Nếu hợp chất chứa liên kết đôi, thì các phân tử thể có thể ở dạng cấu hình E hoặc Z. Nếu hợp chất chứa nhóm mạch vòng không thơm được thể ít nhất hai lần, thì các phân tử thể có thể ở cấu hình cis hoặc trans.

Do đó, sáng chế bao gồm các chất đồng phân đối ảnh, các chất đồng phân không đối quang, các raxemat, các chất đồng phân E, các chất đồng phân Z, các chất đồng phân cis, các chất đồng phân trans và các hỗn hợp của chúng, bất cứ khi nào khả thi về mặt hóa học.

Nghĩa của tất cả các thuật ngữ nêu trên, tức là chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang, raxemat, chất đồng phân E, chất đồng phân Z, chất đồng phân cis, chất đồng phân trans và hỗn hợp của chúng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Cấu hình tuyệt đối được xác định rõ theo hệ thống Cahn-Ingold-Prelog. Cấu hình tại nguyên tử bất đối xứng được quy định bằng R hoặc S. Các chất đồng phân lập thể đã được phân giải mà cấu hình tuyệt đối của chúng là không biết có thể được quy định bằng (+) hoặc (-) tùy thuộc vào chiều mà chúng quay ánh sáng phân cực phẳng. Ví dụ, các chất đồng phân đối ảnh đã được phân giải mà cấu hình tuyệt đối của chúng

là không biết có thể được quy định bằng (+) hoặc (-) tùy thuộc vào chiều mà chúng quay ánh sáng phân cực phẳng theo đó.

Khi chất đồng phân lập thể cụ thể được nhận dạng, điều này có nghĩa là chất đồng phân lập thể này về cơ bản không chứa, tức là được kết hợp với nhỏ hơn 50%, ưu tiên là nhỏ hơn 20%, ưu tiên hơn là nhỏ hơn 10%, thậm chí ưu tiên hơn là nhỏ hơn 5%, đặc biệt là nhỏ hơn 2% và ưu tiên nhất là nhỏ hơn 1%, các chất đồng phân khác. Do đó, khi hợp chất có công thức (I) được quy định, ví dụ, là (R), điều này có nghĩa là hợp chất này về cơ bản không chứa chất đồng phân (S); khi hợp chất có công thức (I) được quy định, ví dụ, là E, điều này có nghĩa là hợp chất này về cơ bản không chứa chất đồng phân Z; khi hợp chất có công thức (I) được quy định, ví dụ, là cis, điều này có nghĩa là hợp chất này về cơ bản không chứa chất đồng phân trans.

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

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

Thuật ngữ “chất đa hình” chỉ khả năng tồn tại ở nhiều hơn một dạng hoặc cấu trúc tinh thể của hợp chất theo sáng chế.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng sản phẩm kết tinh hoặc vô định hình. Chúng có thể được thu nhận, ví dụ, ở dạng bánh rắn, bột hoặc màng bằng các phương pháp như làm kết tủa, làm kết tinh, làm đông khô, sấy phun hoặc làm khô theo kiểu bay hơi. Chúng có thể được sử dụng ở dạng riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế khác hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Thông thường, chúng sẽ được sử dụng ở dạng được phẩm kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng. Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ mà không phải là (các) hợp chất theo sáng chế. Việc lựa chọn tá dược phụ thuộc phần lớn vào các yếu tố như cách thức sử dụng cụ thể, tác dụng của tá dược đối với độ hòa tan và độ ổn định, và bản chất của dạng liều.

Hợp chất theo sáng chế hoặc phân nhóm bất kỳ của chúng có thể được bào chế thành các dạng dược phẩm khác nhau theo mục đích sử dụng. Để làm dược phẩm thích hợp, có thể kể đến tất cả các dược phẩm thường được sử dụng cho các thuốc sử dụng toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu của hợp chất cụ thể, tùy ý ở dạng muối cộng, với vai trò làm thành phần hoạt tính được kết hợp theo cách trộn kỹ với chất mang dược dụng, chất mang này có thể có nhiều dạng khác nhau tùy thuộc vào dạng dược phẩm muốn sử dụng. Tốt hơn là các dược phẩm này ở dạng liều đơn vị thích hợp, ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, trực tràng hoặc qua da. Ví dụ, để bào chế dược phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, môi trường bất kỳ trong số các môi trường dược dụng thông thường có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và dạng tương tự đối với các trường hợp dược phẩm lỏng dùng qua đường miệng như hỗn dịch, xi rô, cồn ngọt, nhũ tương và dung dịch; hoặc các chất mang rắn như tinh bột, đường, cao lanh, chất pha loãng, chất làm trơn, chất gắn kết, chất gây rã và dạng tương tự đối với các trường hợp dược phẩm dạng bột, viên tròn, viên nang và viên nén. Do dễ sử dụng, nên viên nén và viên nang là các dạng liều đơn vị dùng qua đường miệng thuận lợi nhất, trong trường hợp này, các chất mang rắn dược dụng hiển nhiên được sử dụng. Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm các dược phẩm dạng rắn mà có thể được chuyển hóa, ngay trước khi sử dụng, thành dược phẩm dạng lỏng. Trong các dược phẩm thích hợp để sử dụng qua da, chất mang tùy ý chứa chất tăng cường tính thấm và/hoặc chất thấm ướt thích hợp, tùy ý được kết hợp với các chất phụ gia thích hợp có bản chất bất kỳ với tỷ lệ nhỏ, các chất phụ gia này không tạo ra tác dụng có hại đáng kể đối với da. Các chất phụ gia này có thể tạo thuận lợi cho việc sử dụng cho da và/hoặc có thể là hữu ích để bào chế các dược phẩm mong muốn. Các dược phẩm này có thể được sử dụng theo nhiều cách, ví dụ, ở dạng miếng dán trên da, ở dạng bôi đúng chỗ (spot-on), ở dạng thuốc mỡ. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng bằng cách xông hít hoặc bơm vào theo các phương pháp và dạng dược phẩm được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này cho việc sử dụng theo cách này. Do đó, thông thường, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng cho phối ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc bột khô.

Đặc biệt thuận lợi nếu bào chế các dược phẩm nêu trên ở dạng liều đơn vị dễ sử dụng và đồng đều về liều lượng. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các đơn vị tách rời về mặt vật lý thích hợp làm các liều lượng đơn nhất, mỗi

đơn vị chứa lượng đã định trước của thành phần hoạt tính được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị bệnh mong muốn kết hợp với chất mang được dụng cần thiết. Các ví dụ về dạng liều đơn vị này là viên nén (bao gồm viên nén có rãnh hoặc có lớp bao), viên nang, viên tròn, bột đóng gói, viên nhện (wafer), thuốc đạn, dung dịch hoặc hỗn dịch có thể tiêm được và dạng tương tự, và các dạng đa liều riêng rẽ của chúng.

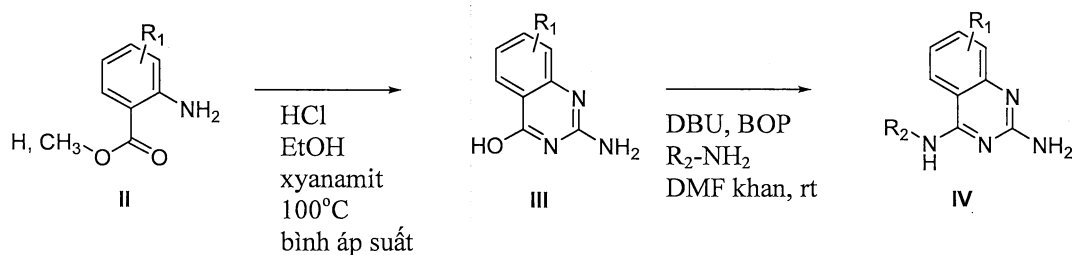
Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực điều trị bệnh lây nhiễm sẽ có khả năng xác định lượng hữu hiệu từ các kết quả thử nghiệm được thể hiện dưới đây. Nhìn chung, lượng hữu hiệu hằng ngày sẽ thường nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 50mg/kg thể trọng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 10mg/kg thể trọng. Có thể là thích hợp nếu sử dụng liều cần thiết ở dạng hai, ba, bốn hoặc nhiều phân liều vào các khoảng cách thời gian thích hợp trong suốt cả ngày. Các phân liều này có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa từ 1 đến 1000mg, và đặc biệt là từ 5 đến 200mg thành phần hoạt tính trong mỗi dạng liều đơn vị.

Liều lượng và tần suất sử dụng chính xác phụ thuộc vào hợp chất có công thức (I) cụ thể được sử dụng, tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị, mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý được điều trị, độ tuổi, cân nặng, và tình trạng thể chất nói chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà cá thể có thể đang dùng, như đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, hiển nhiên là lượng hữu hiệu có thể được làm giảm đi hoặc được làm tăng lên tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào sự đánh giá của bác sĩ điều trị kê đơn hợp chất theo sáng chế. Do đó, khoảng trị số của lượng hữu hiệu nêu trên chỉ là cung cấp hướng dẫn và không nhằm làm giới hạn phạm vi hoặc ứng dụng của sáng chế ở bất kỳ mức độ nào.

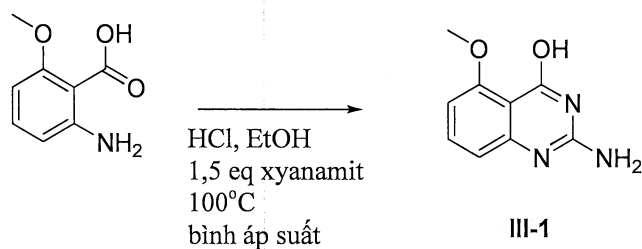
Điều chế hợp chất có công thức (I)

Hợp chất có công thức (I) được điều chế theo sơ đồ 1. Axit hoặc este anthranilic được thể (II) được làm nóng trong điều kiện axit với sự có mặt của xyanamid dư, sử dụng dung môi rượu (ví dụ etanol) hoặc diglyme theo phương pháp được mô tả trong tài liệu kỹ thuật (O'Hara et. al. JOC (1991) 56, p776). Việc thể amin sau đó của 2-amino-4-hydroxyquinazolin (III) có thể tiến hành thông qua một chất liên hợp như BOP hoặc PyBOP với sự có mặt của DBU và amin trong dung môi phân cực không proton (ví dụ DMF).

Sơ đồ 1:

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Quy trình tổng quát để điều chế 2-amino-4-hydroxyquinazolin được thể

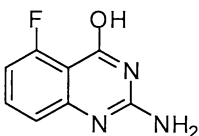
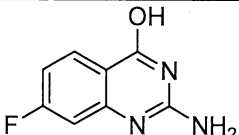
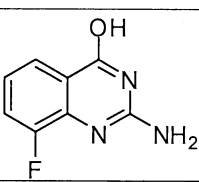
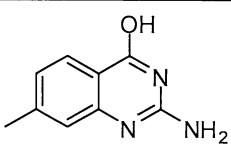
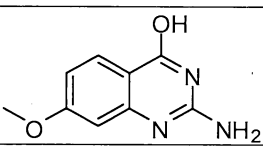
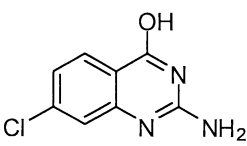
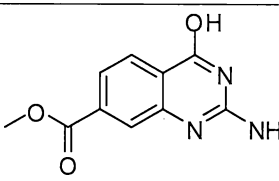
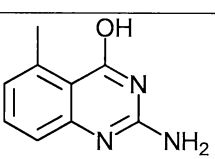
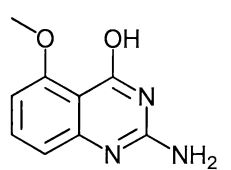


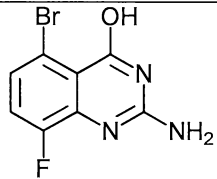
Axit 2-amino-6-metoxybenzoic (25g, 149,6mmol), etanol (200mL), xyanamit (9,43g, 224mmol), và HCl đặc (6mL) được cho vào bình áp suất loại 500mL có trang bị thanh khuấy từ. Hỗn hợp này được để trong điều kiện khuấy ở 100°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được để nguội đến nhiệt độ trong phòng và các chất rắn được phân lập bằng cách lọc và được rửa bằng etanol và DIPE. Sản phẩm thô được làm khô trong chân không ở 50°C để thu được chất rắn màu trắng nhạt.

LC-MS $m/z = 192(M+H)$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,88 (s, 3 H), 6,96 (dd, $J=8,2, 3,1$ Hz, 2 H), 7,69 (t, $J=8,3$ Hz, 1 H), 8,28 (br. s., 2 H), 12,67 (br. s., 1 H)

Bảng I: Các hợp chất có công thức (III). Các hợp chất trung gian nêu dưới đây được điều chế theo phương pháp điều chế III-1.

Số	Cấu trúc	¹ H NMR	LCMS (M+H) ⁺
1		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 6,98 (dd, <i>J</i> =11,0, 8,3 Hz, 1 H), 7,13 (d, <i>J</i> =8,3 Hz, 1 H), 7,51 (br. s., 2 H), 7,64 (td, <i>J</i> =8,3, 5,8 Hz, 1 H), 12,30 (br. s., 1 H)	180
2		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 7,01 - 7,16 (m, 2 H), 7,56 (br. s., 2 H), 7,99 (t, <i>J</i> =7,7 Hz, 1 H), 10,38 - 13,48 (m, 1 H)	180
3		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 6,51-6,67 (m, 2H), 7,00-7,08(m, 1H), 7,42(ddd, <i>J</i> =11,2, 7,9 1,3Hz, 1H), 7,69 (dd, <i>J</i> =7,9, 0,6Hz, 1H), 11,08 (br. s., 1H)	180
4		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,43 (s, 3 H), 7,22 (d, <i>J</i> =1,0 Hz, 1 H), 7,24 (s, 1 H), 7,89 (d, <i>J</i> =8,0 Hz, 1 H), 8,29 (br. s., 2 H), 12,65 (br. s., 1 H)	176
5		Không có	192
6		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 7,41 (dd, <i>J</i> =8,5, 2,0 Hz, 1 H), 7,55 (d, <i>J</i> =2,0 Hz, 1 H), 7,98 (d, <i>J</i> =8,5 Hz, 1 H), 8,49 (br. s., 2 H), 10,79 - 13,69 (m, 1 H)	196
7		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 3,87 - 3,95 (m, 3 H), 7,12 - 7,47 (m, 1 H), 7,83 (dd, <i>J</i> =8,3, 1,4 Hz, 1 H), 7,99 (d, <i>J</i> =1,3 Hz, 1 H), 8,07 - 8,13 (m, 1 H), 8,43 (br. s., 2 H)	220
8		Không có	174 (M-H) ⁻
9	hợp chất tham chiếu 	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 3,74 - 3,82 (m, 3 H), 6,42 (br. s., 2 H), 6,62 (d, <i>J</i> =7,7 Hz, 1 H), 6,75 (dd, <i>J</i> =8,3, 0,8 Hz, 1 H), 7,44 (t, <i>J</i> =8,3 Hz, 1 H), 10,91 (br. s., 1 H)	192

Số	Cấu trúc	H NMR	LCMS (M+H) ⁺
10		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 7,40 (dd, J=8,7, 4,7 Hz, 1 H), 7,48 (t, J=8,8 Hz, 1 H)	NA

Quy trình tổng quát để điều chế hợp chất IV

Hợp chất III (1,5mmol) và DBU (3,75mmol) được hòa tan trong 5mL DMF trong lọ thủy tinh loại 30mL. Sau 5 phút BOP (1,5mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 5 phút và sau đó amin (2,25mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế trên (RP Vydac Denali C18 - 10μm, 250g, 5cm). Pha động (dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, MeOH), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được sản phẩm dưới dạng chất rắn.

Quy trình tổng quát để điều chế các hợp chất 22, 23, 24, 26, 27 và 28

Hợp chất 8 có công thức (I) (xem bảng II) (2,1g, 6,5mmol) được phân phối trong THF (50mL), LiOH (409mg, 9,74mmol) được thêm vào, tiếp đó là MeOH (5mL). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các dung môi được làm bay hơi cho đến khi chỉ còn lại nước. 10mL HCl 1M được thêm vào và hợp chất được chiết bằng 2-metyltetrahydrofuran (2 X 25mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên MgSO₄ và các dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được axit 2-amino-4-[1-(2-pyridyl)ethylamino]quinazolin-7-carboxylic dưới dạng chất rắn màu trắng.

Axit 2-amino-4-[1-(2-pyridyl)ethylamino]quinazolin-7-carboxylic (200mg, 0,65mmol) và PyBOP (421mg, 0,81mmol) được hòa tan trong DMF(5mL) trong lọ thủy tinh loại 30mL. Sau 5 phút, bazơ Hunig (0,557mL, 3,23mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 5 phút và sau đó amin được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng thô được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế trên (RP Vydac Denali C18 - 10μm, 250g, 5cm). Pha động (dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, MeOH), các phân đoạn mong muốn được thu lại,

được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được sản phẩm dưới dạng chất rắn.

Quy trình điều chế hợp chất 29

Hợp chất 12 có công thức (I) (xem bảng II) (1500mg, 4,78mmol) và pyridin hydroclorua (3,32g, 28,7mmol) được hòa tan trong pyridin (20mL) và được làm nóng đến 120°C trong 16 giờ. Pyridin được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần đoạn cặn dư được làm dừng bằng dung dịch NaHCO₃ (bảo hòa trong nước). Chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng nước và được làm khô trong chân không ở 50°C để tạo ra chất rắn màu nâu, chất rắn này được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế (Pha tĩnh: RP Vydac Denali C18 - 10µm, 200g, 5cm), Pha động: dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, CH₃CN), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được 2-amino-4-[(5-methylisoxazol-3-yl)methylamino]quinazolin-5-ol (100mg) dưới dạng chất rắn.

2-amino-4-[(5-methylisoxazol-3-yl)methylamino]quinazolin-5-ol (40mg, 0,15mmol) và Cs₂CO₃ (144mg, 0,44mmol) được hòa tan trong DMF (7,5mL) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. 2-bromoethyl methyl ete (0,018mL, 0,18mmol) được thêm vào và hỗn hợp toàn phần được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần cặn thô được trung hòa bằng HCl 1M và được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế trên (RP Vydac Denali C18 - 10µm, 250g, 5cm). Pha động (dung dịch NH₄HCO₃ 0,25% trong nước, MeOH), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được hợp chất 29 dưới dạng chất rắn.

Quy trình điều chế hợp chất 30

2-amino-5-bromo-quinazolin-4-ol (3g, 12,5mmol), Pd(OAc)₂ (56mg, 0,25mmol), 1,3 bis(diphenylphosphino)propan (206mg, 0,5mmol), kali axetat (2,45g, 25mmol), metanol (25mL) và THF (30mL) được nạp vào nồi hấp bằng thép không gỉ loại 75mL trong môi trường khí N₂. Nồi hấp này được đóng kín và được điều áp đến 50 bar khí CO và phản ứng được tiến hành trong 16 giờ ở 100°C. Chất kết tủa tạo thành được loại bỏ bằng cách lọc, thu được methyl 2-amino-4-hydroxy-quinazolin-5-carboxylat (2,35g).

Metyl 2-amino-4-hydroxy-quinazolin-5-carboxylat (2,35g) trong THF (10mL) được làm lạnh đến 0°C. Sau đó, LiAlH_4 được thêm vào. Hỗn hợp này được để cho đạt đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 16 giờ. EtOAc (5mL) được thêm vào theo từng giọt ở 0°C, sau đó, 3g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ được thêm vào và hỗn hợp toàn phần được khuấy trong 30 phút. Chất kết tủa được lọc ra, và dịch lọc được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và được làm bay hơi đến khô để thu được 2-amino-5-(hydroxymetyl)quinazolin-4-ol (750mg) dưới dạng chất rắn màu vàng.

2-amino-5-(hydroxymetyl)quinazolin-4-ol (300mg, 1,57mmol) được tạo hỗn dịch trong THF (20mL) với DBU (0,586mL, 3,92mmol), sau 5 phút BOP (833mg, 1,88mmol) được thêm vào. Sau 15 phút (5-metyl-3-isoxazolyl)metylamin (0,320mL, 3,14mmol) được thêm vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và sản phẩm thô được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế trên (RP Vydac Denali C18 - 10 μm , 250g, 5cm). Pha động (dung dịch NH_4HCO_3 0,25% trong nước, MeOH), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được hợp chất 30 dưới dạng chất rắn (119mg).

Quy trình điều chế hợp chất 31

Dung dịch NaOMe mới được điều chế (1,25mL, 6,25mmol) được thêm trong môi trường khí N_2 vào hỗn hợp chứa 2-amino-5-bromo-8-flo-quinazolin-4-ol (500mg, 1,94mmol), đồng (I) bromua (39mg, 0,27mmol), EtOAc (0,076mL, 0,78mmol) trong MeOH (5mL). Hỗn hợp này được làm nóng lên trong bình áp suất đến hồi lưu trong 16 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế (Pha tĩnh: RP Vydac Denali C18 - 10 μm , 200g, 5cm), Pha động: dung dịch NH_4HCO_3 0,25% trong nước, MeOH), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được 2-amino-8-flo-5-metoxi-quinazolin-4-ol (150mg) dưới dạng chất rắn.

2-amino-8-flo-5-metoxi-quinazolin-4-ol (150mg, 0,72mmol) được phân phối trong DMF (10mL), DBU (0,536mL, 3,59mmol), được thêm vào và sau đó chất phản ứng BOP (396mg, 0,90mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy và khi nó đồng nhất, (5-metyl-3-isoxazolyl)metylamin (0,115mL, 1,08mmol) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy 16 giờ. Phản ứng được cô dưới áp suất giảm

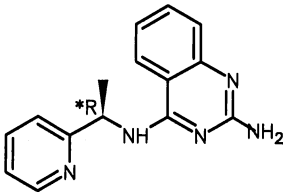
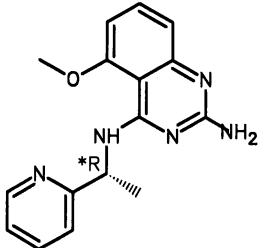
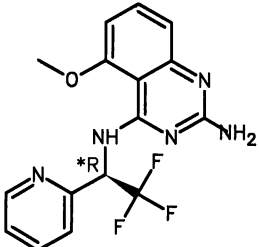
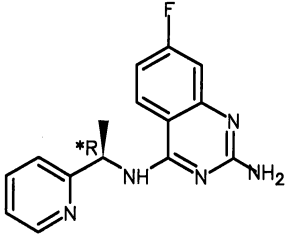
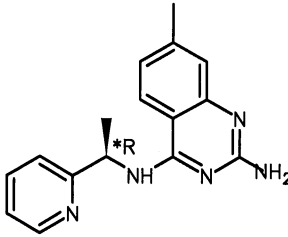
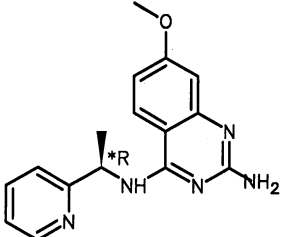
và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế (Pha tĩnh: RP Vydac Denali C18 - 10 μ m, 200g, 5cm), Pha động: dung dịch NH_4HCO_3 0,25% trong nước, MeOH), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được hợp chất 31 dưới dạng chất rắn (64mg).

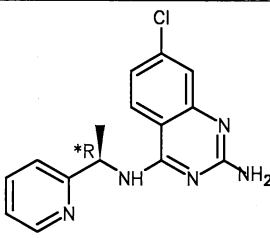
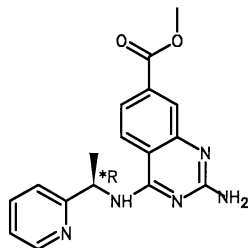
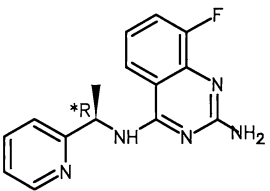
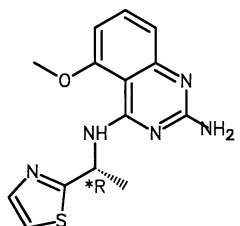
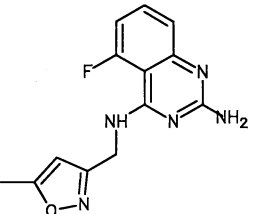
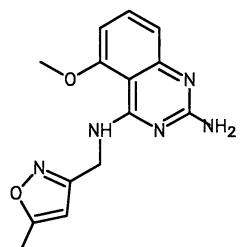
Quy trình điều chế hợp chất 32

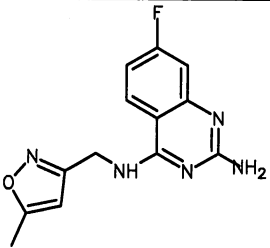
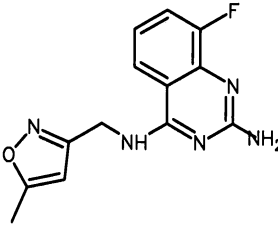
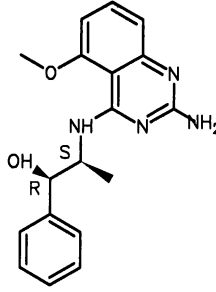
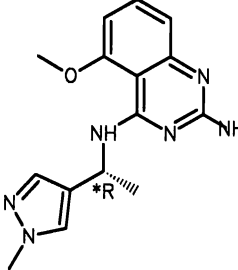
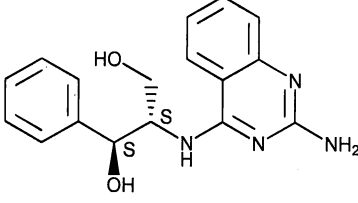
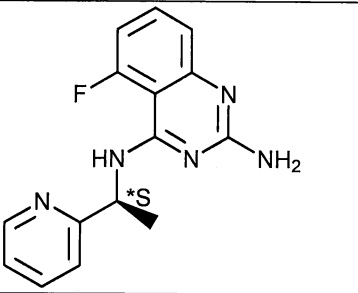
Hợp chất 31 (52,5mg, 0,173mmol) và pyridin hydroclorua (0,12g, 1,039mmol) trong 1mL pyridin được làm nóng đến 120°C trong 16 giờ. Các chất dễ bay hơi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được làm dừng bằng dung dịch NaHCO_3 (bão hòa trong nước). Chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng nước và được làm khô trong chân không ở 50°C để tạo ra 2-amino-8-flo-4-[(5-metylisoxazol-3-yl)metylamino]quinazolin-5-ol (10mg) dưới dạng chất rắn màu nâu.

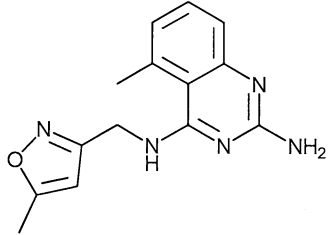
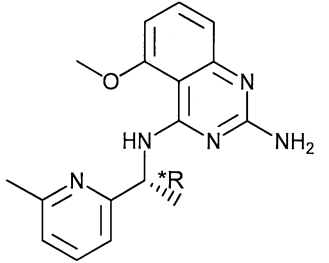
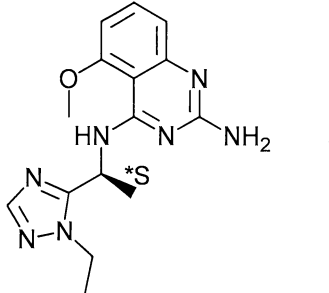
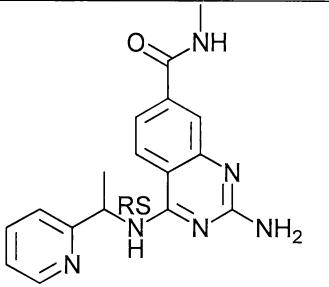
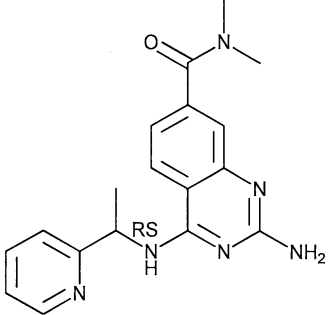
2-amino-8-flo-4-[(5-metylisoxazol-3-yl)metylamino]quinazolin-5-ol (10mg, 0,035mmol) và Cs_2CO_3 (33,8mg, 0,104mmol) trong DMF (5mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. 2-cloetyl metyl ete (4,1mg, 0,043mmol) được thêm vào và hỗn hợp toàn phần được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được hòa tan trong MeOH và chất kết tủa (các muối) được loại bỏ bằng cách lọc. Dịch lọc được cô dưới áp suất giảm và phần cặn thô được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế trên (Pha tĩnh: RP SunFire Prep C18 OBD-10 μ m, 30 x 150 mm), Pha động: dung dịch NH_4HCO_3 0,25% trong nước, CH_3CN), các phân đoạn mong muốn được thu lại, được làm bay hơi, được hòa tan trong MeOH và được làm bay hơi lần nữa để thu được hợp chất 32 dưới dạng chất rắn (2mg).

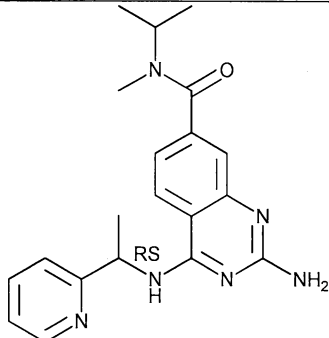
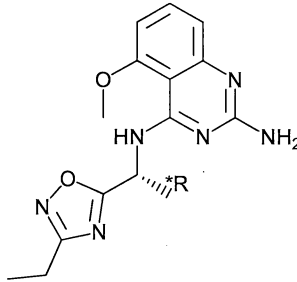
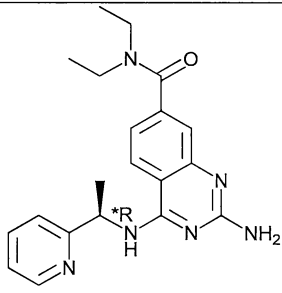
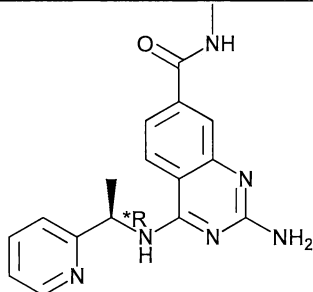
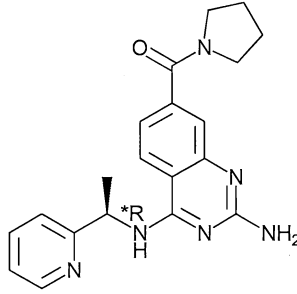
Bảng II: Các hợp chất có công thức (I). Các hợp chất nêu dưới đây được tổng hợp theo một trong số các phương pháp nêu trên.

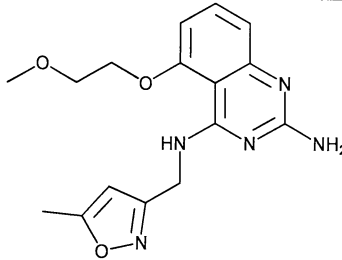
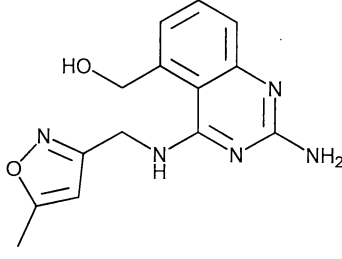
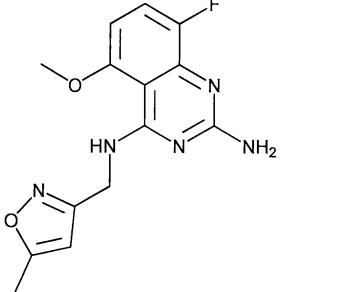
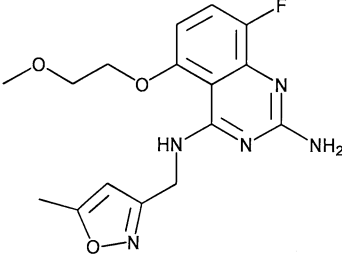
Số	Cấu trúc	¹ H NMR
1		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,60 (d, <i>J</i> =7,3 Hz, 3 H), 5,61 (quin, <i>J</i> =7,3 Hz, 1 H), 5,97 (s, 2 H), 7,05 (ddd, <i>J</i> =8,1, 6,9, 1,2 Hz, 1 H), 7,20 (dd, <i>J</i> =8,4, 0,7 Hz, 1 H), 7,24 (ddd, <i>J</i> =7,5, 4,8, 0,9 Hz, 1 H), 7,44 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 7,49 (ddd, <i>J</i> =8,3, 6,9, 1,3 Hz, 1 H), 7,72 (td, <i>J</i> =7,7, 1,8 Hz, 1 H), 8,05 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 8,18 (dd, <i>J</i> =8,3, 1,0 Hz, 1 H), 8,50 - 8,56 (m, 1 H)
2		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,53 (d, <i>J</i> =6,82 Hz, 3 H) 3,99 (s, 3 H) 5,43 (t, <i>J</i> =6,82 Hz, 1 H) 6,03 (s, 2 H) 6,53 - 6,69 (m, 1 H) 6,81 (dd, <i>J</i> =8,36, 0,88 Hz, 1 H) 7,32 (ddd, <i>J</i> =7,48, 4,84, 1,10 Hz, 1 H) 7,38 (t, <i>J</i> =8,14 Hz, 1 H) 7,46 (d, <i>J</i> =7,92 Hz, 1 H) 7,80 (td, <i>J</i> =7,70, 1,76 Hz, 1 H) 8,54 - 8,72 (m, 1 H) 9,01 (d, <i>J</i> =7,04 Hz, 1 H)
3		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 4,05 (s, 3 H), 6,25 (s, 2 H), 6,43 (quin, <i>J</i> =7,8 Hz, 1 H), 6,62 - 6,68 (m, 1 H), 6,86 (dd, <i>J</i> =8,4, 0,9 Hz, 1 H), 7,44 (t, <i>J</i> =8,1 Hz, 1 H), 7,52 (ddd, <i>J</i> =7,7, 4,8, 1,1 Hz, 1 H), 7,69 (d, <i>J</i> =7,7 Hz, 1 H), 7,95 (td, <i>J</i> =7,7, 1,8 Hz, 1 H), 8,74 - 8,79 (m, 1 H), 9,31 (d, <i>J</i> =8,4 Hz, 1 H)
4		¹ H NMR (400 MHz, CLOROFORM- <i>d</i>) δ ppm 1,60 (d, <i>J</i> =6,6 Hz, 3 H), 5,34 (br. s., 2 H), 5,49 (t, <i>J</i> =6,8 Hz, 1 H), 6,78 (td, <i>J</i> =8,6, 2,6 Hz, 1 H), 7,02 (dd, <i>J</i> =10,8, 2,6 Hz, 1 H), 7,19 (ddd, <i>J</i> =7,5, 4,8, 1,1 Hz, 1 H), 7,26 - 7,31 (m, 1 H), 7,59 (d, <i>J</i> =6,8 Hz, 1 H), 7,65 (td, <i>J</i> =7,6, 1,9 Hz, 1 H), 7,73 (dd, <i>J</i> =9,0, 5,9 Hz, 1 H), 8,53 - 8,61 (m, 1 H)
5		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,58 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 2,35 (s, 3 H), 5,59 (quin, <i>J</i> =7,3 Hz, 1 H), 5,94 (s, 2 H), 6,90 (dd, <i>J</i> =8,3, 1,2 Hz, 1 H), 7,01 (s, 1 6 H), 7,23 (dd, <i>J</i> =6,9, 5,2 Hz, 1 H), 7,43 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 7,72 (td, <i>J</i> =7,7, 1,8 Hz, 1 H), 7,97 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 8,07 (d, <i>J</i> =8,4 Hz, 1 H), 8,48 - 8,57 (m, 1 H)
6		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,57 (d, <i>J</i> =7,04 Hz, 3 H) 3,80 (s, 3 H) 5,58 (t, <i>J</i> =7,37 Hz, 1 H) 5,89 (s, 2 H) 6,61 (d, <i>J</i> =2,42 Hz, 1 H) 6,67 (dd, <i>J</i> =8,91, 2,53 Hz, 1 H) 7,23 (ddd, <i>J</i> =7,48, 4,84, 0,88 Hz, 1 H) 7,42 (d, <i>J</i> =7,92 Hz, 1 H) 7,72 (td, <i>J</i> =7,70, 1,76 Hz, 1 H) 7,89 (d, <i>J</i> =8,14 Hz, 1 H) 8,08 (d, <i>J</i> =9,02 Hz, 1 H) 8,52 (dt, <i>J</i> =3,96, 0,88 Hz, 1 H)

Số	Cấu trúc	H NMR
7		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,59 (d, $J=7,3$ Hz, 3 H), 5,53 - 5,65 (m, 1 H), 6,21 (br. s., 2 H), 7,07 (dd, $J=8,7$, 2,1 Hz, 1 H), 7,18 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 7,24 (ddd, $J=7,4$, 4,8, 1,0 Hz, 1 H), 7,43 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 7,73 (td, $J=7,6$, 1,9 Hz, 1 H), 8,19 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 8,23 (d, $J=8,8$ Hz, 1 H), 8,50 - 8,56 (m, 1 H)
8		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,60 (d, $J=7,0$ Hz, 3 H), 3,88 (s, 3 H), 5,61 (quin, $J=7,2$ Hz, 1 H), 6,22 (s, 2 H), 7,25 (ddd, $J=7,5$, 4,8, 0,9 Hz, 1 H), 7,45 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 7,54 (dd, $J=8,6$, 1,8 Hz, 1 H), 7,70 - 7,77 (m, 2 H), 8,28 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 8,32 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 8,51 - 8,57 (m, 1 H)
9		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,60 (d, $J=7,04$ Hz, 3 H), 5,61 (quin, $J=7,26$ Hz, 1 H), 6,25 (br. s., 2 H), 6,99 (td, $J=7,98$, 4,95 Hz, 1 H), 7,25 (ddd, $J=7,48$, 4,84, 0,88 Hz, 1 H), 7,29 - 7,36 (m, 1 H), 7,44 (d, $J=7,92$ Hz, 1 H), 7,73 (td, $J=7,65$, 1,87 Hz, 1 H), 8,01 (d, $J=8,14$ Hz, 1 H), 8,17 (d, $J=8,14$ Hz, 1 H), 8,52 - 8,59 (m, 1 H)
10		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,69 (d, $J=7,0$ Hz, 3 H), 3,96 (s, 3 H), 5,80 (quin, $J=7,1$ Hz, 1 H), 6,09 (s, 2 H), 6,60 (dd, $J=8,0$, 0,8 Hz, 1 H), 6,83 (dd, $J=8,4$, 0,9 Hz, 1 H), 7,40 (t, $J=8,3$ Hz, 1 H), 7,61 (d, $J=3,1$ Hz, 1 H), 7,77 (d, $J=3,3$ Hz, 1 H), 8,37 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H)
11		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,35 (d, $J=0,9$ Hz, 3 H), 4,72 (d, $J=5,3$ Hz, 2 H), 6,22 (d, $J=0,7$ Hz, 1 H), 6,35 (s, 2 H), 6,80 (ddd, $J=12,3$, 7,9, 0,9 Hz, 1 H), 7,04 (dd, $J=8,4$, 0,9 Hz, 1 H), 7,46 (td, $J=8,2$, 6,5 Hz, 1 H), 7,71 - 7,82 (m, 1 H)
12		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,36 (d, $J=0,7$ Hz, 3 H), 3,92 (s, 3 H), 4,70 (d, $J=5,7$ Hz, 2 H), 6,05 (s, 2 H), 6,20 (d, $J=0,7$ Hz, 1 H), 6,56 (dd, $J=8,0$, 0,8 Hz, 1 H), 6,81 (dd, $J=8,4$, 0,9 Hz, 1 H), 7,38 (t, $J=8,1$ Hz, 1 H), 8,40 (t, $J=5,8$ Hz, 1 H)

Số	Cấu trúc	¹ H NMR
13		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,33 - 2,38 (m, 3 H), 4,67 (d, <i>J</i> =5,9 Hz, 2 H), 6,18 - 6,24 (m, 1 H), 6,27 (s, 2 H), 6,85 - 6,92 (m, 2 H), 7,99 - 8,07 (m, 1 H), 8,42 (t, <i>J</i> =5,7 Hz, 1 H)
14		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,35 (d, <i>J</i> =0,9 Hz, 3 H), 4,69 (d, <i>J</i> =5,9 Hz, 2 H), 6,22 (d, <i>J</i> =0,9 Hz, 1 H), 6,39 (br. s., 2 H), 6,98 (td, <i>J</i> =8,0, 4,8 Hz, 1 H), 7,33 (ddd, <i>J</i> =11,4, 7,8, 1,1 Hz, 1 H), 7,79 (d, <i>J</i> =8,4 Hz, 1 H), 8,48 (t, <i>J</i> =5,8 Hz, 1 H)
15		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 0,97 (d, <i>J</i> =6,6 Hz, 3 H), 3,92 (s, 3 H), 4,44 - 4,55 (m, 1 H), 4,89 (d, <i>J</i> =3,1 Hz, 1 H), 5,69 (br. s., 1 H), 6,06 (s, 2 H), 6,52 - 6,58 (m, 1 H), 6,79 (dd, <i>J</i> =8,3, 0,8 Hz, 1 H), 7,22 - 7,29 (m, 1 H), 7,32 - 7,41 (m, 3 H), 7,43 - 7,49 (m, 2 H), 8,07 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H)
16		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,51 (d, <i>J</i> =6,8 Hz, 3 H), 3,79 (s, 3 H), 3,90 (s, 3 H), 5,39 (quin, <i>J</i> =7,0 Hz, 1 H), 6,05 (s, 2 H), 6,52 - 6,58 (m, 1 H), 6,79 (dd, <i>J</i> =8,4, 0,9 Hz, 1 H), 7,35 (t, <i>J</i> =8,3 Hz, 1 H), 7,45 (s, 1 H), 7,68 (s, 1 H), 7,84 (d, <i>J</i> =7,7 Hz, 1 H)
17		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 3,40 - 3,49 (m, 1 H), 3,60 - 3,71 (m, 1 H), 4,45 - 4,55 (m, 1 H), 4,79 (br. s., 1 H), 4,97 - 5,05 (m, 1 H), 5,62 (d, <i>J</i> =4,8 6 Hz, 1 H), 5,98 (s, 2 H), 7,02 (t, <i>J</i> =7,5 Hz, 1 H), 7,08 (d, <i>J</i> =8,3 Hz, 1 H), 7,13 - 7,21 (m, 2 H), 7,27 (t, <i>J</i> =7,5 Hz, 2 H), 7,38 (d, <i>J</i> =7,3 Hz, 2 H), 7,42 - 7,50 (m, 1 H), 7,95 (d, <i>J</i> =8,3 Hz, 1 H)
18		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,55 (d, <i>J</i> =6,82 Hz, 3 H) 5,49 (td, <i>J</i> =6,77, 2,09 Hz, 1 H) 6,32 (s, 2 H) 6,82 (ddd, <i>J</i> =12,76, 7,92, 0,88 Hz, 1 H) 7,05 (dd, <i>J</i> =8,47, 0,99 Hz, 1 H) 7,33 (ddd, <i>J</i> =7,54, 4,90, 0,99 Hz, 1 H) 7,42 - 7,57 (m, 2 H) 7,82 (td, <i>J</i> =7,70, 1,76 Hz, 1 H) 7,93 (dd, <i>J</i> =14,63, 6,93 Hz, 1 H) 8,58 - 8,67 (m, 1 H)

Số	Cấu trúc	H NMR
19		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,33 - 2,39 (m, 3 H), 2,75 (s, 3 H), 4,71 (d, $J=5,3$ Hz, 2 H), 6,06 (s, 2 H), 6,22 - 6,26 (m, 1 H), 6,82 (d, $J=6,8$ Hz, 1 H), 7,08 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H), 7,13 (t, $J=5,3$ Hz, 1 H), 7,32 (dd, $J=8,4$, 7,3 Hz, 1 H)
20		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,49 (d, $J=6,6$ Hz, 3 H), 2,58 (s, 3 H), 4,02 (s, 3 H), 5,37 (quin, $J=6,6$ Hz, 1 H), 6,02 (s, 2 H), 6,56 - 6,62 (m, 1 H), 6,81 (dd, $J=8,3$, 0,8 Hz, 1 H), 7,20 (d, $J=7,5$ Hz, 1 H), 7,24 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H), 7,37 (t, $J=8,1$ Hz, 1 H), 7,70 (t, $J=7,7$ Hz, 1 H), 9,21 (d, $J=6,8$ Hz, 1 H)
21		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,36 (t, $J=7,3$ Hz, 3 H), 1,57 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H), 3,95 (s, 3 H), 4,21 - 4,42 (m, 2 H), 5,65 (quin, $J=7,0$ Hz, 1 H), 6,08 (br. s., 2 H), 6,58 (dd, $J=7,9$, 0,7 Hz, 1 H), 6,81 (dd, $J=8,4$, 0,7 Hz, 1 H), 7,39 (t, $J=8,1$ Hz, 1 H), 7,88 (s, 1 H), 8,26 (d, $J=7,7$ Hz, 1 H)
22		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,60 (d, $J=7,3$ Hz, 3 H), 2,80 (d, $J=4,4$ Hz, 3 H), 5,60 (quin, $J=7,3$ Hz, 1 H), 6,11 (s, 2 H), 7,24 (ddd, $J=7,4$, 4,8, 1,0 Hz, 1 H), 7,45 (dt, $J=8,4$, 1,8 Hz, 2 H), 7,65 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H), 7,73 (td, $J=7,7$, 1,8 Hz, 1 H), 8,16 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 8,25 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 8,49 - 8,56 (m, 2 H)
23		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,60 (d, $J=7,0$ Hz, 3 H), 2,91 (s, 3 H), 3,00 (s, 3 H), 5,61 (quin, $J=7,3$ Hz, 1 H), 6,12 (s, 2 H), 7,02 (dd, $J=8,3$, 1,7 Hz, 1 H), 7,12 (d, $J=1,5$ Hz, 1 H), 7,24 (ddd, $J=7,5$, 4,8, 0,9 Hz, 1 H), 7,44 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 7,73 (td, $J=7,7$, 1,8 Hz, 1 H), 8,16 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 8,24 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 8,51 - 8,56 (m, 1 H)

Số	Cấu trúc	¹ H NMR
24		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,03 - 1,20 (m, 6 H), 1,60 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 2,68 - 2,89 (m, 3 H), 3,76 - 3,91 (m, 1 H), 5,61 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 1 H), 6,13 (br. s., 2 H), 6,94 - 7,02 (m, 1 H), 7,02 - 7,12 (m, 1 H), 7,24 (ddd, <i>J</i> =7,4, 4,8, 1,0 Hz, 1 H), 7,44 (s, 1 H), 7,73 (td, <i>J</i> =7,7, 2,0 Hz, 1 H), 8,15 (s, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 8,50 - 8,57 (m, 1 H)
25		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,23 (t, <i>J</i> =7,5 Hz, 3 H), 1,68 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 2,71 (q, <i>J</i> =7,6 Hz, 2 H), 3,96 (s, 3 H), 5,71 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 1 H), 6,05 (br. s., 2 H), 6,57 - 6,62 (m, 1 H), 6,83 (dd, <i>J</i> =8,5, 0,8 Hz, 1 H), 7,41 (t, <i>J</i> =8,1 Hz, 1 H), 8,31 (d, <i>J</i> =7,5 Hz, 1 H)
26		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,05 (br. s., 3 H), 1,16 (br. s., 3 H), 1,60 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 3,20 (br. s., 2 H), 3,43 (br. s., 2 H), 5,60 (quin, <i>J</i> =7,3 Hz, 1 H), 6,11 (s, 2 H), 6,97 (dd, <i>J</i> =8,3, 1,7 Hz, 1 H), 7,05 (d, <i>J</i> =1,3 Hz, 1 H), 7,24 (ddd, <i>J</i> =7,4, 4,8, 1,0 Hz, 1 H), 7,45 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 7,73 (td, <i>J</i> =7,6, 1,9 Hz, 1 H), 8,15 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 8,24 (d, <i>J</i> =8,4 Hz, 1 H), 8,50 - 8,56 (m, 1 H)
27		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,60 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 2,79 (d, <i>J</i> =4,4 Hz, 3 H), 5,60 (quin, <i>J</i> =7,3 Hz, 1 H), 6,09 (s, 2 H), 7,24 (ddd, <i>J</i> =7,4, 4,8, 1,0 Hz, 1 H), 7,41 - 7,48 (m, 2 H), 7,65 (d, <i>J</i> =1,5 Hz, 1 H), 7,73 (td, <i>J</i> =7,7, 2,0 Hz, 1 H), 8,15 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 8,24 (d, <i>J</i> =8,6 Hz, 1 H), 8,48 - 8,56 (m, 2 H)
28		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,60 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 1,76 - 1,93 (m, 4 H), 3,37 (t, <i>J</i> =6,5 Hz, 2 H), 3,47 (t, <i>J</i> =6,8 Hz, 2 H), 5,60 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 1 H), 6,10 (s, 2 H), 7,12 (dd, <i>J</i> =8,3, 1,7 Hz, 1 H), 7,22 (d, <i>J</i> =1,5 Hz, 1 H), 7,23 - 7,26 (m, 1 H), 7,44 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 7,73 (td, <i>J</i> =7,7, 1,8 Hz, 1 H), 8,15 (d, <i>J</i> =7,9 Hz, 1 H), 8,23 (d, <i>J</i> =8,6 Hz, 1 H), 8,50 - 8,56 (m, 1 H)

Số	Cấu trúc	¹ H NMR
29		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,33 - 2,42 (m, 3 H) 3,27 (s, 3 H) 3,64 - 3,80 (m, 2 H) 4,16 - 4,31 (m, 2 H) 4,69 (d, <i>J</i> =5,50 Hz, 2 H) 6,12 (s, 2 H) 6,21 - 6,29 (m, 1 H) 6,59 (d, <i>J</i> =7,48 Hz, 1 H) 6,82 (d, <i>J</i> =7,70 Hz, 1 H) 7,37 (t, <i>J</i> =8,25 Hz, 1 H) 8,37 (s, 1 H)
30		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 0,87 (t, <i>J</i> =7,26 Hz, 3 H) 1,23 - 1,38 (m, 2 H) 1,38 - 1,49 (m, 2 H) 1,54 (d, <i>J</i> =7,04 Hz, 3 H) 3,33 - 3,50 (m, 2 H) 5,38 (t, <i>J</i> =7,26 Hz, 1 H) 6,10 (s, 2 H) 7,05 (dd, <i>J</i> =7,04, 1,32 Hz, 1 H) 7,30 (dd, <i>J</i> =8,47, 1,21 Hz, 1 H) 7,48 (dd, <i>J</i> =8,36, 7,04 Hz, 1 H) 7,53 (dd, <i>J</i> =1,87, 0,77 Hz, 1 H) 7,68 (t, <i>J</i> =4,73 Hz, 1 H) 9,09 (d, <i>J</i> =1,98 Hz, 1 H) 9,39 (d, <i>J</i> =8,14 Hz, 1 H)
31		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 2,28 - 2,40 (m, 3 H) 3,90 (s, 3 H) 4,71 (d, <i>J</i> =5,94 Hz, 2 H) 6,21 (d, <i>J</i> =0,88 Hz, 1 H) 6,33 (br. s., 2 H) 6,46 (dd, <i>J</i> =8,80, 3,52 Hz, 1 H) 7,26 (dd, <i>J</i> =10,89, 8,69 Hz, 1 H) 8,49 (t, <i>J</i> =5,72 Hz, 1 H)
32		Không có

Các phương pháp tinh chế SFC

Quy trình tổng quát

Quy trình tách bằng kỹ thuật sắc ký lỏng siêu tới hạn (SFC: Supercritical Fluid Chromatography) được thực hiện với CO₂ siêu tới hạn và chất làm biến đổi như được định rõ trong bảng sử dụng cột như được định rõ trong bảng.

Bảng III: Các hợp chất có công thức (I). Các hợp chất nêu dưới đây được phân lập bằng quy trình tách SFC.

#	Cột	Chất làm biến đổi
1	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,2%
2	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	MeOH với iPrNH ₂ 0,2%
3	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,2%
4	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,2%
5	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,4%
6	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,2%
7	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,2%
8	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,2%
9	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,2%
10	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,4%
16	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,2%
18	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	iPrOH với iPrNH ₂ 0,2%
20	Chiralpak Diacel AS 20 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,2%
21	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,2%
25	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	MeOH với iPrNH ₂ 0,4%
26	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,2%
27	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	MeOH với iPrNH ₂ 0,4%
28	Chiralpak Diacel AD 30 x 250mm	EtOH với iPrNH ₂ 0,4%

Đối với tất cả các hợp chất, hợp chất rửa giải đầu tiên được chỉ định là *R.

*R có nghĩa là cấu hình tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh mà hóa học lập thể tuyệt đối của nó là không biết.

Các phương pháp phân tích

Quy trình tổng quát

Quy trình đo bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) được thực hiện bằng cách sử dụng bơm LC, bộ phận phát hiện mảng điốt (DAD) hoặc UV và cột như được định rõ trong các phương pháp tương ứng. Nếu cần, các bộ phận phát hiện bổ sung có thể được bao gồm (xem bảng về các phương pháp nêu dưới đây).

Dòng chảy ra từ cột được đưa sang thiết bị đo khối phổ (MS: Mass Spectrometer) mà được cấu tạo với nguồn ion áp suất khí quyển. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có kiến thức trong việc thiết đặt các thông số điều chỉnh (ví dụ, khoảng trị số quét, thời gian ngâm...) để thu nhận được các ion cho phép nhận dạng phân tử lượng (MW) đơn đồng vị trên danh nghĩa của hợp chất. Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

Các hợp chất được mô tả bằng thời gian lưu thí nghiệm (R_t) và các ion của chúng. Nếu không được chỉ định rõ theo cách khác trong bảng dữ liệu, ion phân tử được báo cáo tương ứng với $[M+H]^+$ (phân tử đã được proton hóa) và/hoặc $[M-H]^-$ (phân tử đã được tách proton). Trong trường hợp hợp chất không thể ion hóa trực tiếp, thì dạng sản phẩm cộng được chỉ định rõ (tức là $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, v.v). Đối với các phân tử có nhiều kiểu đồng vị (Br, Cl..), trị số được báo cáo là trị số thu được cho khối lượng đồng vị thấp nhất. Tất cả các kết quả được thu nhận với độ không chắc chắn của thí nghiệm mà thường có liên quan đến phương pháp được sử dụng.

Dưới đây, “SQD” có nghĩa là thiết bị phát hiện tứ cực đơn, “MSD” có nghĩa là thiết bị phát hiện chọn lọc khối lượng, “RT” có nghĩa là nhiệt độ trong phòng, “BEH” có nghĩa là thể lai etylsiloxan/silic oxit được nối cầu, “DAD” có nghĩa là thiết bị phát hiện mảng điốt, “HSS” có nghĩa là silic oxit có độ bền cao.

Bảng IV: Mã phương pháp LCMS (Dòng chảy được biểu diễn bằng đơn vị mL/phút; nhiệt độ cột (T) được biểu diễn bằng đơn vị °C; thời gian chạy được biểu diễn bằng đơn vị phút).

Mã phương pháp	Thiết bị	Cột	Pha động	Gradien	Dòng chảy	Thời gian chạy
					Cột T	
B7010 B7014	Waters: Acquity®	Waters: HSS T3	A: 95% CH ₃ COONH	Từ 100% A đến 5% A trong 2,10	0,8	3,5

	UPLC® - DAD và SQD	(1,8µm, 2,1*100mm)	4 10mM + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	phút, đến 0% A trong 0,90 phút, đến 5% A trong 0,5 phút	55	
B8011 B8002	Waters: Acquity® UPLC® - DAD và SQD	Waters: BEH C18 (1,7µm, 2,1*50mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 10mM + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Từ 95% A đến 5% A trong 1,3 phút, giữ trong 0,7 phút.	0,8 55	2
B9007 B9008	Waters: Acquity® UPLC® - DAD và SQD	Waters: HSS T3 (1,8µm, 2,1*100mm)	A: 95% CH ₃ COONH 4 10mM + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Từ 100% A đến 5% A trong 2,10 phút, đến 0% A trong 0,90 phút, đến 5% A trong 0,5 phút	0,8 55	3,5

Bảng V: Các hợp chất có công thức (I). Các hợp chất nêu dưới đây được xác định đặc điểm theo một trong số các phương pháp nêu trên.

#	Mã phương pháp	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng phát hiện thấy (M+H)
1	B7010B7014	0,61	266
2	B7010B7014	1,59	296
3	B9007B9008	1,61	350
4	B8011B8002	0,69	284
5	B7010B7014	1,39	280
6	B7010B7014	1,31	296
7	B8011B8002	0,78	300
8	B9007B9008	1,32	324
9	B9007B9008	1,29	284
10	B9007B9008	1,31	302
11	B8011B8002	0,69	274
12	B7010B7014	1,26	286
13	B8011B8002	0,64	274
14	B7010B7014	1,32	274
15	B8011B8002	0,77	325
16	B8011B8002	0,62	299
17	B8011B8002	0,53	311

#	Mã phương pháp	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng phát hiện thấy (M+H)
18	B8011B8002	0,79	284
19	B8011B8002	0,65	270
20	B8011B8002	0,84	310
21	B8011B8002	0,61	314
22	B8011B8002	0,56	323
23	B8011B8002	0,59	337
24	B8011B8002	0,70	365
25	B8011B8002	0,75	315
26	B8011B8002	0,69	365
27	B8011B8002	0,56	323
28	B8011B8002	0,66	363
29	B8011B8002	0,70	330
30	B9007B9008	1,04	286
31	B9007B9008	1,36	304
32	B9007B9008	1,46	348

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

Mô tả các thử nghiệm sinh học

Đánh giá hoạt tính của TLR7 và TLR8

Khả năng hoạt hóa TLR7 và/hoặc TLR8 của người của các hợp chất được đánh giá trong thử nghiệm chỉ thị tế bào bằng cách sử dụng các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm tạm thời với vectơ biểu hiện TLR7 hoặc TLR8 và cấu trúc chỉ thị NF κ B-luc.

Một cách ngắn gọn, các tế bào HEK293 được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy (DMEM có bổ sung FCS 10% và glutamin 2mM). Để chuyển nhiễm các tế bào trong các đĩa loại 15cm, các tế bào được tách ra bằng Trypsin-EDTA, được chuyển nhiễm với hỗn hợp chứa CMV-TLR7 hoặc TLR8 plasmid (1700ng), NF κ B-luc plasmid (850ng) và chất phản ứng chuyển nhiễm và được ủ trong 48 giờ ở 37°C trong môi trường khí CO₂ 5% đã được làm ẩm. Sau đó, các tế bào đã được chuyển nhiễm

được rửa trong PBS, được tách bằng Trypsin-EDTA và được tái tạo huyền phù trong môi trường đến mật độ là $1,25 \times 10^5$ tế bào/mL. Sau đó, 40 μ L tế bào được phân phối vào mỗi lỗ trong các đĩa loại 384 lỗ, trong đó đã có 200nL hợp chất trong DMSO 100%. Sau khi ủ trong 6 giờ ở 37°C, CO₂ 5%, hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách thêm 15 μ L cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và đọc dữ liệu trên thiết bị tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Đường cong đáp ứng liều được tạo ra từ các phép đo được thực hiện lặp lại bốn lần. Trị số nồng độ hữu hiệu thấp nhất (LEC), được định nghĩa là nồng độ mà gây ra tác dụng cao hơn ít nhất là hai lần so với độ lệch chuẩn của thử nghiệm, được xác định cho từng hợp chất.

Độc tính của hợp chất được xác định một cách song song bằng cách sử dụng dãy pha loãng tương tự của hợp chất với 40 μ L tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc CMV-TLR7 đơn lẻ trong mỗi lỗ ($1,25 \times 10^5$ tế bào/mL), trong các đĩa loại 384 lỗ. Khả năng sống sót của tế bào được đo sau khi ủ 6 giờ ở 37°C, CO₂ 5% bằng cách thêm 15 μ L ATP lite (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và đọc trên thiết bị tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Dữ liệu được báo cáo dưới dạng CC₅₀.

Một cách song song, dãy pha loãng tương tự của hợp chất được sử dụng (200nL hợp chất trong DMSO 100%) với 40 μ L tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc chỉ thị NF κ B-luc đơn lẻ trong mỗi lỗ ($1,25 \times 10^5$ tế bào/mL). Sau khi ủ trong 6 giờ ở 37°C, CO₂ 5%, hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách thêm 15 μ L cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và đọc dữ liệu trên thiết bị tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Dữ liệu về sàng lọc đối (counterscreen) được báo cáo dưới dạng LEC.

Hoạt hóa các yếu tố vùng khởi đầu ISRE

Khả năng gây cảm ứng IFN-I của các hợp chất cũng được đánh giá bằng cách đo sự hoạt hóa các yếu tố đáp ứng được kích thích bằng interferon (ISRE: interferon-stimulated responsive element) bằng môi trường đã được điều hòa từ PBMC. Yếu tố ISRE có trình tự GAAACTGAACT có khả năng đáp ứng cao đối với yếu tố phiên mã STAT1-STAT2-IRF9, được hoạt hóa khi liên kết IFN-I với thụ thể IFNAR của chúng (Clontech, PT3372-5W). Plasmid pISRE-Luc từ Clontech (ref. 631913) chứa 5 bản sao của yếu tố ISRE này, theo sau là ORF luxiferaza đom đóm. Dòng tế bào

HEK293 được chuyển nhiễm ổn định với pISRE-Luc (HEK-ISREluc) được thiết lập để định hình môi trường nuôi cấy tế bào PBMC đã được điều hòa.

Một cách ngắn gọn, các PBMC được chuẩn bị từ lớp máu không đông chứa hầu hết là bạch cầu và tiểu cầu (buffy coat) của ít nhất hai đối tượng cho bằng cách sử dụng quy trình ly tâm Ficoll tiêu chuẩn. Các PBMC đã được phân lập được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI có bổ sung huyết thanh AB người 10% và 2×10^5 tế bào được phân phối vào mỗi lỗ trong các đĩa loại 384 lỗ chứa các hợp chất (tổng thể tích là 70 μ L). Sau khi ủ qua đêm, 10 μ L dịch nổi bề mặt được chuyển sang các đĩa loại 384 lỗ chứa 5×10^3 tế bào HEK-ISREluc/lỗ trong 30 μ L (được đặt vào đĩa vào ngày trước đó). Sau khi ủ trong 24 giờ, sự hoạt hóa các yếu tố ISRE được đo bằng cách thử nghiệm hoạt tính luxiferaza bằng cách sử dụng 40 μ L cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) trong mỗi lỗ và được đo bằng thiết bị tạo ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Hoạt tính kích thích của từng hợp chất đối với các tế bào HEK-ISREluc được báo cáo dưới dạng trị số LEC, được định nghĩa là nồng độ hợp chất được sử dụng cho các PBMC để gây ra hoạt tính luxiferaza cao hơn ít nhất là hai lần so với độ lệch chuẩn của thử nghiệm. Đến lượt, LEC chỉ mức độ hoạt hóa ISRE đối với việc chuyển lượng xác định của môi trường nuôi cấy PBMC. Interferon α -2a (Roferon-A) tái tổ hợp được sử dụng làm hợp chất đối chứng tiêu chuẩn.

Bảng VI: Hoạt tính sinh học

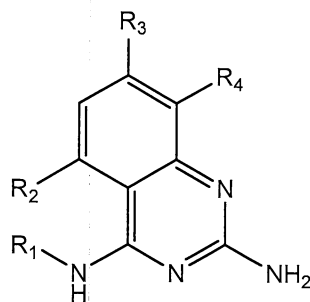
Số	TLR7 của người (LEC) μ M	TLR8 của người (LEC) μ M	HEK-ISRE luc (LEC) μ M
1	0,72	>25	0,61
2	0,94	>25	0,49
3	0,76	>25	0,47
4	0,92	19,8	0,59
5	0,53	14,7	0,11
6	3,75	>25	0,64
7	0,82	16,4	0,38
8	4,94	NA	2,11
9	5,21	>25	1,68
10	0,42	12,3	0,11
11	0,45	3,09	0,082

Số	TLR7 của người (LEC) μM	TLR8 của người (LEC) μM	HEK-ISRE luc (LEC) μM
12	0,047	1,94	0,036
13	0,46	5,22	0,12
14	0,65	>25	0,13
15	0,61	>25	0,56
16	2,44	9,14	0,55
17	0,83	5,51	0,16
18	8,25	24,3	7,83
19	0,11	1,74	0,051
20	1,46	>25	0,62
21	6,1	8,85	0,54
22	14,7	>25	2,20
23	6,67	>25	1,62
24	14,3	11,0	1,75
25	1,95	6,62	0,49
26	2,14	>25	7,33
27	8,24	>25	5,04
28	2,24	>25	1,57
29	0,082	8,15	NA
30	0,63	9,0	0,14
31	0,74	>25	0,46
32	NA	NA	NA

NA = không có. Tất cả các hợp chất đều thể hiện không có độc tính lên tới nồng độ cao nhất được thử nghiệm. Tất cả các hợp chất đều thể hiện không có hoạt tính (LEC >25 μM) trong thử nghiệm đối sàng lọc HEK 293 NF-kB nêu trên.

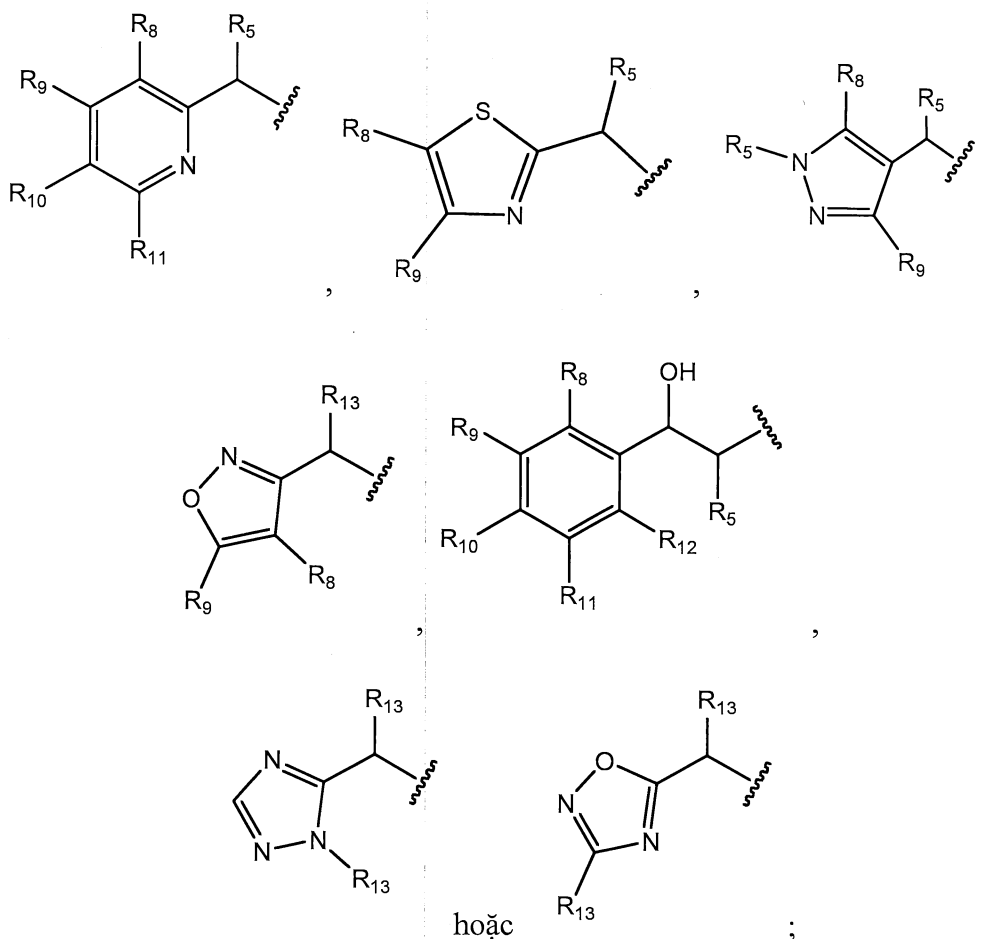
Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối, tautome, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của nó, trong đó:

R₁ có cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc nêu dưới đây:



R₂ là hydro, -O-(C₁₋₃)-alkyl, halogen, (C₁₋₃)-alkyl, -O-(C₁₋₃)-alkyl-O-(C₁₋₃)-alkyl hoặc CH₂OH;

R_3 là hydro, $-O-(C_{1-3})\text{-alkyl}$, halogen, $(C_{1-3})\text{-alkyl}$ hoặc $-C(=O)-R_7$ trong đó R_7 là $-O-(C_{1-3})\text{-alkyl}$, NH_2 , $NH(CH_3)$, $N(CH_3)_2$, $N(CH_3)(C_{1-3})\text{-alkyl}$, $N((C_{1-3})\text{-alkyl})_2$ hoặc pyrrolidin;

R_4 là hydro hoặc flo;

R_5 là $(C_{1-3})\text{-alkyl}$, $(C_{1-3})\text{-flo-alkyl}$ hoặc CH_2OH ;

R_6 là NH_2 , $NH(CH_3)$ hoặc $N(CH_3)_2$, (hetero)-anilin được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều nhóm trong số các nhóm R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} hoặc R_{12} hoặc (hetero)-benzylamin được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều nhóm trong số các nhóm R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} hoặc R_{12} , mỗi nhóm R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} và R^{12} giống nhau hoặc khác nhau độc lập được chọn từ hydro, $(C_{1-3})\text{-alkyl}$, $-O-(C_{1-3})\text{-alkyl}$ hoặc halogen,

và

R_{13} là hydro, $(C_{1-3})\text{-alkyl}$ hoặc $(C_{1-3})\text{-flo-alkyl}$.

2. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, tautome, chất đồng phân lập thể, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của nó theo điểm 1 cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.