



(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) 
1-0020029

(51)⁷ **C07D 401/06, A61K 31/506**

(13) **B**

(21)	1-2015-04504	(22)	23.05.2014		
(86)	PCT/EP2014/060603	23.05.2014	(87)	WO2014/187932	27.11.2014
(30)	13169076.0	24.05.2013	EP		
(45)	26.11.2018	368	(43)	25.05.2016	338
(73)	JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (IE) Eastgate Village, Eastgate, Little Island, Co Cork, Ireland				
(72)	MC GOWAN, David Craig (US), RABOISSON, Pierre Jean-Marie Bernard (FR)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **HỢP CHẤT PYRIDON VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH NHIỄM VIRUT VÀ CÁC BỆNH KHÁC**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pyridon, quy trình điều chế chúng và dược phẩm chứa chúng để sử dụng trong điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất pyridon, quy trình điều chế chúng và dược phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến hợp chất pyridon thích hợp để sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm virus, các rối loạn miễn dịch hoặc rối loạn viêm, trong đó có liên quan đến quá trình điều biến, hoặc chủ vận, các thụ thể giống Toll (toll-like receptor - TLR). 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 thủ. 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 xytokin 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 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 đơn giản là TLR1 đến TLR13) đã được nhận diện ở người và chuột nhắt, và các dạng tương đương của nhiều loại trong số này 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, mà 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 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.

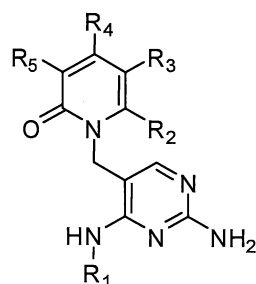
Các hợp chất thể hiện hoạt tính trên các thụ thể giống Toll đã được mô tả như các hợp chất purin trong WO 2006 117670, các hợp chất adenin trong WO 98/01448 và WO 99/28321, và các pyrimidin trong WO 2009/067081. Các hợp chất pyridon hữu dụng để điều trị các bệnh nhiễm virus, bệnh viêm và bệnh tự miễn được bộc lộ trong WO 2011/007116.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu lớn về các chất điều biến thụ thể giống Toll mà có tính chọn lọc ưu tiên và profin độ an toàn cải thiện so với các hợp chất đã biết trong các giải pháp kỹ thuật 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 pyridon và dược phẩm chứa chúng để điều trị bệnh nhiễm virus và các bệnh khác.

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



(I)

hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng, trong đó:

R₁ là C₁₋₆ alkyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ aryl, halogen, hydroxyl, amino, axit carboxylic, este của axit carboxylic, amit của axit carboxylic, axyl sulfonamid, C₁₋₃ alkyl, C₃₋₆ xycloalkyl, sulfon, sulfoxit, sulfonamid, dị vòng hoặc nitril;

R₂, R₃, R₄ và R₅ độc lập được chọn từ hydro, halogen, C₁₋₃ alkyl, C₁₋₃ alkoxy, C₃₋₆ xycloalkyl, aryl, -CF₃ hoặc dị vòng;

hoặc trong đó:

R₂ được ngưng tụ với R₃ để tạo ra cấu trúc vòng,

R₃ được ngưng tụ với R₄ để tạo ra cấu trúc vòng, hoặc

R₄ được ngưng tụ với R₅ để tạo ra cấu trúc vòng.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) trong đó R₁ là *n*-butyl và trong đó R₂, R₃, R₄ và R₅ là hydro.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) trong đó R₁ là *n*-butyl và trong đó R₂ được ngưng tụ với R₃ để tạo ra cấu trúc vòng, R₃ được ngưng tụ với R₄ để tạo ra cấu trúc vòng hoặc R₄ được ngưng tụ với R₅ để tạo ra cấu trúc vòng.

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Ngoài ra, hợp chất có công thức (I) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng có thể được sử dụng làm thuốc.

Theo đó, hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc thể đa hình được dụng của chúng, hoặc dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc thể đa hình được dụng của chúng có thể được sử dụng trong điều trị rối loạn bất kỳ trong đó có liên quan đến quá trình điều biến TLR7 và/hoặc TLR8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “alkyl” chỉ hydrocacbon béo no mạch thẳng hoặc mạch nhánh có số lượng nguyên tử cacbon xác định.

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

Thuật ngữ “xycloalkyl” chỉ vòng cacbon có số lượng nguyên tử cacbon xác định.

Thuật ngữ “alkoxy” chỉ nhóm alkyl (chuỗi cacbon và hydro) liên kết đơn với oxy như, ví dụ, nhóm metoxy hoặc nhóm etoxy.

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

Thuật ngữ “dị vòng” chỉ các phân tử no hoặc no một phần và bao gồm etyloxit, tetrahydrofuran, dioxan hoặc các este vòng khác. Dị vòng chứa nitơ bao gồm, ví dụ azetidin, morpholin, piperidin, piperazin, pyrrolidin. Các dị vòng khác bao gồm, ví dụ, thiomorpholin, dioxolinyll và các sulfon vòng.

Thuật ngữ “cấu trúc vòng” có nghĩa là gốc dạng một vòng no hoặc no một phần có 5 đến 7 cạnh, tốt hơn là 6 cạnh, tùy ý chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh.

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

Thuật ngữ “thể 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 khô lạnh, sấy phun hoặc làm khô theo kiểu bay hơi. Chúng có thể được sử dụng ở dạng đơn lẻ hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất khác theo sáng chế hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Thông thường, chúng sẽ được sử dụng ở dạng chế 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 cho các mục đích sử dụng. Để làm các chế phẩm thích hợp, có thể kể đến tất cả các chế phẩm thường được sử dụng cho các thuốc dùng toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng có tác dụng của hợp chất cụ thể, tùy ý ở dạng muối cộng, với vai trò là thành phần hoạt tính được kết hợp bằng cách trộn kỹ với chất mang dược dụng, chất mang này có thể có nhiều dạng khác nhau tùy thuộc vào dạng chế phẩm mong muốn để 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 các chế 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 đối với các trường hợp chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như hỗn dịch, xi rô, cốm 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 đối với các trường hợp chế 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. Cũng được bao gồm là các chế phẩm dạng rắn mà có thể được chuyển hóa, trong khoảng thời gian ngắn trước khi sử dụng, thành các chế phẩm dạng lỏng. Trong các chế phẩm thích hợp để sử dụng qua da, chất mang tùy ý chứa chất tăng cường tính thấm và/hoặc chất thẩm 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 chế phẩm mong muốn. Các chế 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 bằng các phương pháp và các chế phẩm đã 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 phổi ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc bột khô.

Đặc biệt thuận lợi nếu bào chế được phẩm nêu trên ở dạng liều đơn vị để 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 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 chia phần 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 các liều bội được phân chia của chúng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực điều trị bệnh lây nhiễm sẽ có khả năng xác định được lượng có tác dụng từ các kết quả thử nghiệm được thể hiện dưới đây. Nhìn chung, dự định là lượng hằng ngày có tác dụng sẽ 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.

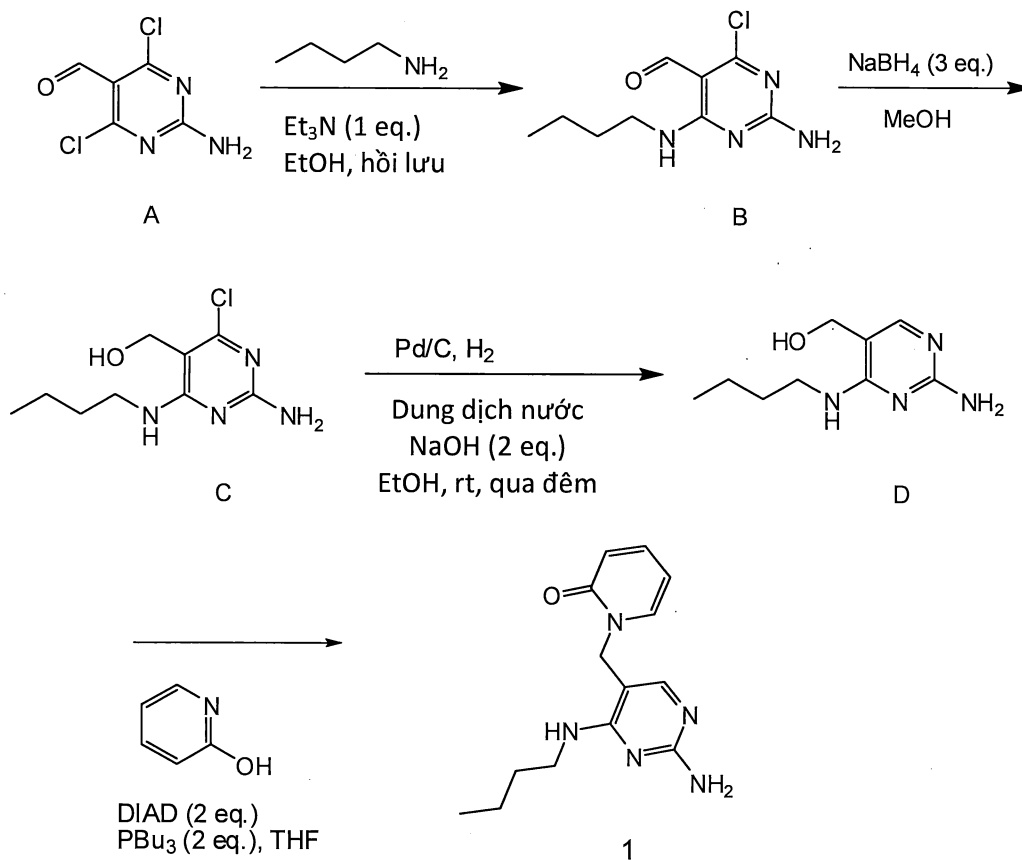
Liều lượng và tần suất sử dụng chính xác phụ thuộc vào hợp chất có công thức (I) cụ thể được sử dụng, tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị, mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh lý được điều trị, độ tuổi, cân nặng, và tình trạng thể chất nói chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà cá thể 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 có tác dụng 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 về lượng có tác dụng nêu trên chỉ là hướng dẫn và không nhằm làm giới hạn phạm vi hoặc ứng dụng của sáng chế ở bất kỳ mức độ nào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Điều chế các hợp chất

Hợp chất có công thức (I) được điều chế theo sơ đồ 1.

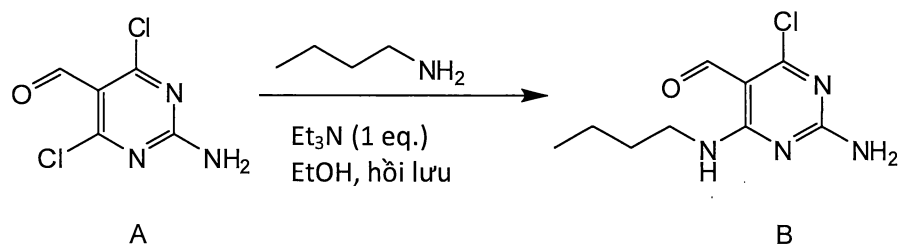
Sơ đồ 1 (trong đó quy trình điều chế hợp chất 1 được nêu làm ví dụ):



Các hợp chất loại A trong sơ đồ 1 có thể được tạo chức với amin trong điều kiện nhiệt trong dung môi phân cực, ví dụ etanol, có hoặc không có bazơ (ví dụ triethylamin). Nhóm aldehyt của B có thể được chuyển hóa thành rượu nhờ chất khử như NaBH_4 trong dung môi phân cực (ví dụ metanol). Clo trong hợp chất loại C có thể được loại bỏ bằng cách sử dụng Pd/C trong môi trường khí hydro và điều kiện bazơ. Sau đó, nhóm rượu được tạo chức trong điều kiện Mitsunobu tiêu chuẩn để tạo ra sản phẩm pyridon cuối.

Quy trình điều chế các hợp chất trung gian A và B được mô tả trong tài liệu kỹ thuật (Bioorganic and Medicinal Chemistry 11, 2003, p4161; J. Heterocyclic Chem., 20, 41 (1983); Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 13 (2003) p217).

Điều chế B

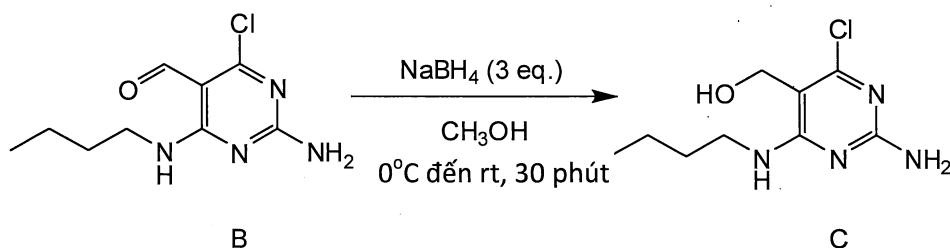


A (10,0g, 52,08mmol) được thêm vào etanol (100mL), sau đó *n*-butylamin (3,81g, 52,08mmol) và triethylamin (5,27g, 52,08mmol) được thêm vào dung dịch này. Hỗn hợp này được làm nóng đến hồi lưu trong 8 giờ. Dung dịch này được để cho đạt đến 0°C và chất rắn được tách ra bằng cách lọc và được rửa bằng etanol, sau đó được làm khô trong chân không để tạo ra B (10g).

LC-MS m/z = 229 (M+H); 1,20 phút

^1H NMR (400 MHz, *d*-Cloroform) δ ppm 0,95 (t, 3 H), 1,31 - 1,42 (m, 2 H), 1,53 - 1,65 (m, 2 H), 3,40 - 3,50 (m, 2 H), 5,11 (br. s., 2 H), 9,22 (br. s., 1 H), 10,07 (s, 1 H)

Điều chế C



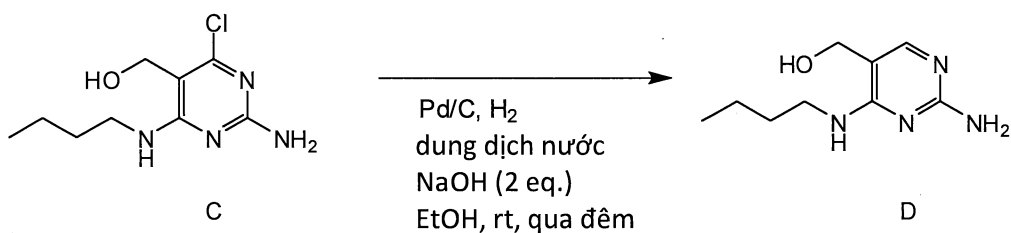
NaBH_4 (4g, 105,73mmol) được thêm theo từng phần nhỏ vào hỗn hợp chứa B (8,0g, 35mmol) trong metanol ở 0°C. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng (rt) trong 30 phút. Hỗn hợp này được xử lý bằng NaHCO_3 bão hòa (100mL) và H_2O (100mL) một cách từ từ ở 0°C, sau đó được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Chất kết tủa được tách ra bằng cách lọc và được rửa bằng nước (50mL) và etyl axetat : metyl *t*-butyl ete (1:5). Dịch lọc được chiết bằng etyl axetat (2 x 200mL). Các lớp hữu cơ gộp lại được rửa bằng nước muối, được làm khô (Na_2SO_4), các chất rắn được lấy ra bằng cách lọc và dung môi của dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được xử lý bằng etyl axetat : metyl *t*-butyl ete (1:5).

Chất kết tủa được tách ra bằng cách lọc và được rửa bằng methyl *t*-butyl ete. Các chất kết tủa được gộp lại và được làm khô (chân không, 50°C, 30 phút) để tạo ra C.

LC-MS $m/z = 231$ (M+H), 0,90 phút

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0,90 (t, 3 H), 1,31 (m, 2 H), 1,50 (m, 2 H), 3,28 (m, 2 H), 4,4 (m, 2 H), 4,92 (m, 1 H), 6,29 (br. s., 2 H), 6,55 (m, 1 H)

Điều chế D

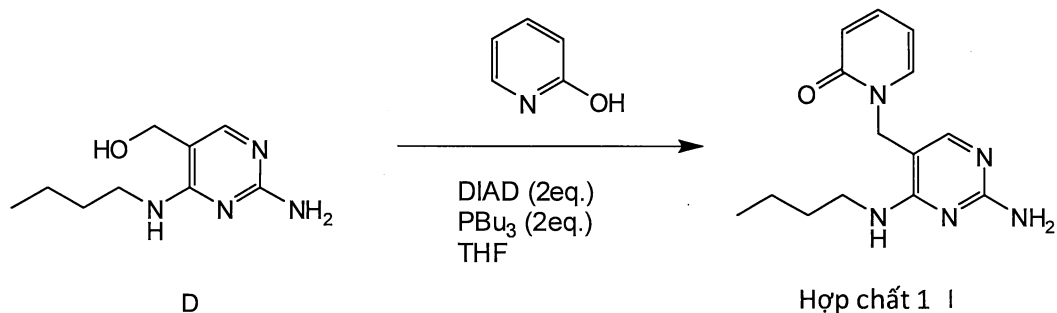


Dung dịch chứa NaOH (1,6g, 40mmol) trong H_2O (5mL) được thêm vào dung dịch chứa C (5,8g, 21,37mmol, độ tinh khiết 85%) trong ethanol (150mL) ở nhiệt độ trong phòng. Pd/C 10% (0,6g) được thêm vào hỗn hợp này. Bình được bịt kín và được cho tiếp xúc với khí hydro trong 15 giờ. Khí hydro được loại bỏ và được thay bằng nitơ, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi của dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Etyl axetat được thêm vào và hỗn hợp này được rửa bằng H_2O , nước muối, được làm khô (Na_2SO_4). Các chất rắn được lấy ra bằng cách lọc và dung môi của dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần cặn được rửa bằng methyl *t*-butyl ete. Chất kết tủa được tách ra bằng cách lọc và được rửa bằng methyl *t*-butyl ete. Chất rắn được thu lại và được làm khô (chân không, 50°C, 30 phút) để tạo ra D.

LC-MS $m/z = 197$ (M+H); 3,21 phút

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0,90 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,24 - 1,41 (m, 2 H), 1,41 - 1,59 (m, 2 H), 3,23 - 3,34 (m, 2 H), 4,21 (br. s., 2 H), 4,85 (br. s., 1 H), 5,87 (s, 2 H), 6,19 (t, $J=5,3$ Hz, 1 H), 7,50 (s, 1 H)

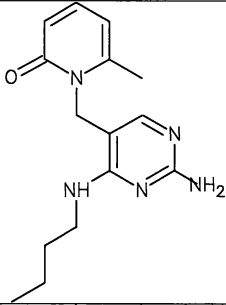
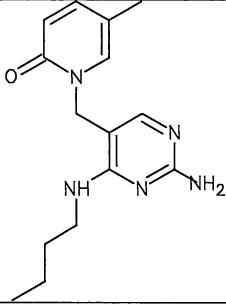
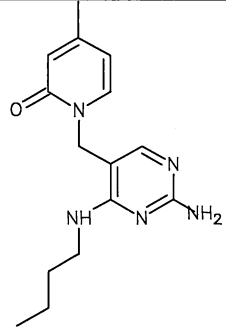
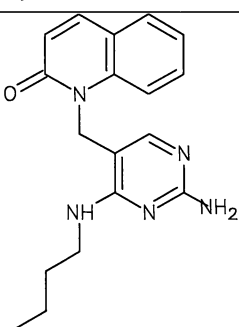
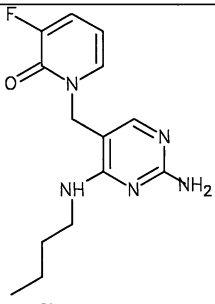
Điều chế hợp chất 1

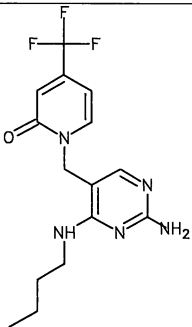
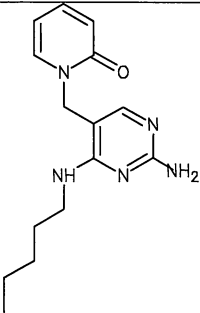
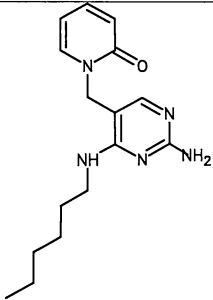
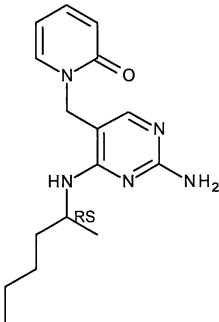


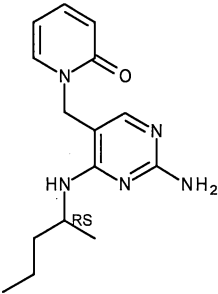
DIAD (1,3g, 6,429mmol) được thêm vào hỗn hợp chứa D (0,5g, 2,29mmol, độ tinh khiết 90%), 2-hydroxypyridin (0,326g, 3,43mmol) và tributylphosphin (1,34g, 6,62mmol) trong THF khan (10mL) ở 0°C trong môi trường khí N₂. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và sau đó được đun hồi lưu trong 3 giờ. Hỗn hợp này được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được xử lý bằng ete dầu mỏ : metyl *t*-butyl ete (1:1). Hỗn hợp này được làm bay hơi dưới áp suất giảm. Metyl *t*-butyl ete được thêm vào. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 20 phút. Chất kết tủa được tách ra bằng cách lọc và được rửa bằng metyl *t*-butyl ete. Chất rắn được thu lại và được làm khô (chân không, 50°C, 30 phút) để tạo ra hợp chất 1.

Bảng 1. Hợp chất có công thức (I).

Hợp chất số	Cấu trúc	H NMR	Phương pháp LC, thời gian lưu (phút)
1		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 0,85 (t, <i>J</i> =7,4 Hz, 3 H), 1,26 (dq, <i>J</i> =15,0, 7,3 Hz, 2 H), 1,44 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 2 H), 3,19 - 3,27 (m, 2 H), 4,79 (s, 2 H), 6,02 (s, 2 H), 6,33 (td, <i>J</i> =6,7, 1,3 Hz, 1 H), 6,48 (d, <i>J</i> =8,8 Hz, 1 H), 7,30 (t, <i>J</i> =5,0 Hz, 1 H), 7,45 (ddd, <i>J</i> =9,0, 6,8, 2,0 Hz, 1 H), 7,74 (dd, <i>J</i> =6,8, 1,5 Hz, 1 H), 7,85 (s, 1 H)	A, 3,77

Hợp chất số	Cấu trúc	¹ H NMR	Phương pháp LC, thời gian lưu (phút)
2		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,94 (t, <i>J</i> =7,3 Hz, 3 H), 1,29 - 1,42 (m, 2 H), 1,62 (quin, <i>J</i> =7,3 Hz, 2 H), 2,51 (s, 3 H), 3,52 (t, <i>J</i> =6,9 Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 6,43 (d, <i>J</i> =6,8 Hz, 1 H), 6,57 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 1 H), 7,46 - 7,57 (m, 2 H)	A, 3,82
3		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,94 (t, <i>J</i> =7,4 Hz, 3 H), 1,27 - 1,40 (m, 2 H), 1,55 - 1,65 (m, 2 H), 2,14 (s, 3 H), 3,49 (t, <i>J</i> =7,0 Hz, 2 H), 4,97 (s, 2 H), 6,60 (d, <i>J</i> =9,3 Hz, 1 H), 7,50 (dd, <i>J</i> =9,2, 2,4 Hz, 1 H), 7,58 (s, 1 H), 7,91 (s, 1 H)	A, 3,84
4		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,95 (t, <i>J</i> =7,4 Hz, 3 H), 1,35 (dd, <i>J</i> =14,9, 7,4 Hz, 2 H), 1,52 - 1,62 (m, 2 H), 2,25 (s, 3 H), 3,36 (t, <i>J</i> =7,0 Hz, 2 H), 4,91 (s, 2 H), 6,37 (dd, <i>J</i> =7,0, 2,0 Hz, 1 H), 6,45 (s, 1 H), 7,57 (d, <i>J</i> =7,0 Hz, 1 H), 7,82 (s, 1 H)	A, 3,98
5		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,98 (t, <i>J</i> =7,4 Hz, 3 H), 1,34 - 1,47 (m, 2 H), 1,67 (quin, <i>J</i> =7,4 Hz, 2 H), 3,53 - 3,60 (m, 2 H), 5,34 (s, 2 H), 6,78 (d, <i>J</i> =9,5 Hz, 1 H), 7,34 - 7,42 (m, 1 H), 7,51 (s, 1 H), 7,58 (d, <i>J</i> =8,5 Hz, 1 H), 7,65 - 7,73 (m, 1 H), 7,79 (d, <i>J</i> =7,8 Hz, 1 H), 8,05 (d, <i>J</i> =9,3 Hz, 1 H)	A, 4,29
6		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,96 (t, <i>J</i> =7,3 Hz, 3 H), 1,37 (sxt, <i>J</i> =7,5 Hz, 2 H), 1,58 - 1,69 (m, 2 H), 3,53 (t, <i>J</i> =7,0 Hz, 2 H), 5,09 (s, 2 H), 6,45 - 6,53 (m, 1 H), 7,46 (t, <i>J</i> =8,3 Hz, 1 H), 7,66 (br. s., 1 H), 7,95 (br. s., 1 H)	A, 3,26

Hợp chất số	Cấu trúc	¹ H NMR	Phương pháp LC, thời gian lưu (phút)
7		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,92 (t, <i>J</i> =7,4 Hz, 3 H), 1,33 (dq, <i>J</i> =15,0, 7,4 Hz, 2 H), 1,55 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 2 H), 3,36 (t, <i>J</i> =6,9 Hz, 2 H), 4,97 (s, 2 H), 6,61 (dd, <i>J</i> =7,3, 2,0 Hz, 1 H), 6,88 (s, 1 H), 7,84 (s, 1 H), 7,89 (d, <i>J</i> =7,3 Hz, 1 H)	A, 4,33
8		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,91 (t, <i>J</i> =7,0 Hz, 3 H), 1,18 - 1,40 (m, 4 H), 1,59 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 2 H), 3,35 - 3,39 (m, 2 H), 4,96 (s, 2 H), 6,48 (td, <i>J</i> =6,8, 1,3 Hz, 1 H), 6,63 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 1 H), 7,57 (ddd, <i>J</i> =9,0, 6,8, 2,0 Hz, 1 H), 7,71 (dd, <i>J</i> =6,8, 1,8 Hz, 1 H), 7,85 (s, 1 H), không thấy các proton có thể trao đổi được.	A, 4,12
9		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,87 - 0,95 (m, 3 H), 1,28 - 1,37 (m, 6 H), 1,53 - 1,64 (m, 2 H), 3,37 (t, <i>J</i> =7,0 Hz, 2 H), 4,96 (s, 2 H), 6,45 - 6,54 (m, 1 H), 6,63 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 1 H), 7,57 (ddd, <i>J</i> =9,0, 6,8, 2,0 Hz, 1 H), 7,71 (dd, <i>J</i> =6,8, 1,5 Hz, 1 H), 7,85 (s, 1 H)	A, 4,47
10		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,86 (t, <i>J</i> =7,2 Hz, 3 H), 1,09 - 1,17 (m, 3 H), 1,17 - 1,35 (m, 4 H), 1,46 - 1,57 (m, 2 H), 4,11 - 4,22 (m, 1 H), 4,79 - 4,87 (m, 1 H), 5,03 - 5,11 (m, 1 H), 6,49 (t, <i>J</i> =6,8 Hz, 1 H), 6,63 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 1 H), 7,57 (ddd, <i>J</i> =9,0, 6,8, 2,0 Hz, 1 H), 7,66 - 7,73 (m, 1 H), 7,85 (s, 1 H)	A, 4,31

Hợp chất số	Cấu trúc	¹ H NMR	Phương pháp LC, thời gian lưu (phút)
11		¹ H NMR (400 MHz, METANOL- <i>d</i> ₄) δ ppm 0,88 (t, <i>J</i> =7,3 Hz, 3 H), 1,13 (d, <i>J</i> =6,5 Hz, 3 H), 1,16 - 1,33 (m, 2 H), 1,39 - 1,63 (m, 2 H), 4,09 - 4,25 (m, 1 H), 4,86 (d, <i>J</i> =14,8 Hz, 1 H), 5,04 (d, <i>J</i> =14,8 Hz, 1 H), 6,47 (td, <i>J</i> =6,8, 1,3 Hz, 1 H), 6,62 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 1 H), 7,56 (ddd, <i>J</i> =9,0, 6,8, 2,0 Hz, 1 H), 7,69 (dd, <i>J</i> =6,9, 1,6 Hz, 1 H), 7,84 (s, 1 H)	A, 4,05

Phương pháp phân tích: Tất cả các hợp chất đều được xác định đặc điểm bằng kỹ thuật LC-MS bằng cách sử dụng phương pháp nêu dưới đây:

Phương pháp A.

Cột	YMC-PACK ODS-AQ, 50×2,0mm 5μm		
Pha động	A: H ₂ O (0,1%TFA)		
	B: CH ₃ CN (0,05%TFA)		
Gradien	Thời gian ngừng: 10 phút		
	Thời gian (phút)	A%	B%
	0	100	0
	1	100	0
	5	40	60
	7,5	40	60
	8	100	0
Lưu lượng	0,8mL/phút		
Bước sóng	UV 220nm		
Nhiệt độ lò	50°C		
Độ phân cực MS	dương		
LCMS	Agilent 1100		

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

Mô tả các thử nghiệm sinh học

Đánh giá hoạt tính 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 có sử dụng các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm tạm thời với vectơ biểu hiện TLR7 hoặc TLR8 và cấu trúc chỉ thị NFκB-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 plasmit (1700ng), NFκB-luc plasmit (850ng) và chất phản ứng chuyển nhiễm và được ủ trong 48 giờ ở 37°C trong môi trường khí CO₂ 5% ẩm. Sau đó, các tế bào đã chuyển nhiễm được rửa trong PBS, được tách ra 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, 40μL 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 15μL 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: lowest effective concentration), 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 40μL 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 15μL 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 40μL tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc chỉ thị NFκB-luc đơn lẻ trong mỗi lỗ ($1,25 \times 10^5$ tế bào/mL). Sau khi ủ trong sáu giờ ở 37°C, CO₂ 5%, hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách thêm 15μL 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 đối sàng lọc (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.

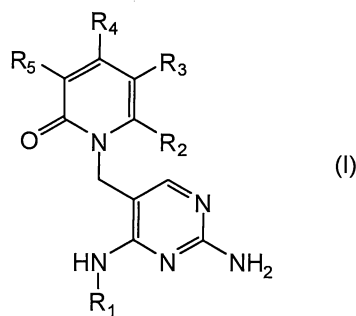
Một cách ngắn gọn, các PBMC được chuẩn bị từ lớp máu không đông chứa hầu hết là bạch cầu và tiểu cầu (buffy coat) của ít nhất hai đối tượng cho bằng cách sử dụng quy trình ly tâm Ficoll tiêu chuẩn. Các PBMC đã phân lập được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI có bổ sung huyết thanh AB người 10% và 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 $70 \mu\text{L}$). Sau khi ủ qua đêm, $10 \mu\text{L}$ dịch nổi bề mặt được chuyển sang các đĩa loại 384 lỗ chứa 5×10^3 tế bào HEK-ISREluc/lỗ trong $30 \mu\text{L}$ (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 $40 \mu\text{L}$ 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. LEC chỉ mức độ hoạt hóa ISRE đối với việc chuyển lượng xác định của môi trường nuôi cấy PBMC. Interferon α -2a tái tổ hợp (Roferon-A) được sử dụng làm hợp chất đối chứng tiêu chuẩn.

Hoạt tính sinh học của hợp chất có công thức (I). Tất cả các hợp chất đều thể hiện $\text{CC50} > 24 \mu\text{M}$.

Số	TLR 7 của người (LEC) μM	TLR 8 của người (LEC) μM	HEK-ISRE luc (LEC) μM
1	1,8	7,3	0,7
2	1,1	2,1	0,8
3	0,8	10,3	0,3
4	0,5	2,2	0,5
5	0,9	2,7	0,04
6	1,2	6,9	0,5
7	0,5	6,8	0,5
8	1,5	>25	0,6
9	7,3	>25	3
10	1,0	16	0,3
11	1,3	14,6	0,3

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng, trong đó:

R_1 là C_{1-6} alkyl, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ aryl, trong đó aryl là cấu trúc vòng thơm có 5, 6 hoặc 7 nguyên tử trên vòng, halogen, hydroxyl, amino, axit carboxylic, este của axit carboxylic, amit của axit carboxylic, axyl sulfonamid, C_{1-3} alkyl, C_{3-6} xycloalkyl, sulfon, sulfoxit, sulfonamid, dị vòng no hoặc no một phần hoặc nitril;

R_2 , R_3 , R_4 và R_5 độc lập được chọn từ hydro, halogen, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkoxy, C_{3-6} xycloalkyl, aryl, trong đó aryl là cấu trúc vòng thơm có 5, 6 hoặc 7 nguyên tử trên vòng, $-CF_3$ hoặc dị vòng no hoặc no một phần;

hoặc trong đó:

R_2 được ngưng tụ với R_3 để tạo ra cấu trúc vòng dạng một vòng no hoặc no một phần có 5 đến 7 cạnh,

R_3 được ngưng tụ với R_4 để tạo ra cấu trúc vòng dạng một vòng no hoặc no một phần có 5 đến 7 cạnh, hoặc

R_4 được ngưng tụ với R_5 để tạo ra cấu trúc vòng dạng một vòng no hoặc no một phần có 5 đến 7 cạnh.

2. Hợp chất có công thức (I) theo điểm 1, trong đó R_1 là *n*-butyl và trong đó R_2 , R_3 , R_4 và R_5 là hydro.

3. Hợp chất có công thức (I) theo điểm 1, trong đó R_1 là *n*-butyl và trong đó R_2 được ngưng tụ với R_3 để tạo ra cấu trúc vòng, R_3 được ngưng tụ với R_4 để tạo ra cấu trúc vòng, hoặc R_4 được ngưng tụ với R_5 để tạo ra cấu trúc vòng.

4. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối hoặc solvat dược dụng của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.