



(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) 

1-0021521

(51)⁷ **C07D 239/48, A61K 31/505, A61P 31/12**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2015-02716 | (22) | 20.02.2014 | | |
| (86) | PCT/EP2014/053273 | 20.02.2014 | (87) | WO2014/128189 | 28.08.2014 |
| (30) | 13156167.2 | 21.02.2013 | EP | | |
| (45) | 26.08.2019 | 377 | (43) | 25.01.2016 | 334 |
| (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),
JONCKERS, Tim Hugo Maria (BE) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | | | |
-

(54) **HỢP CHẤT 2-AMINOPYRIMIDIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY
ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH NHIỄM VIRUT**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất 2-aminopyrimidin, quy trình điều chế và dược phẩm chứa chúng, để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virut.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất 2-aminopyrimidin, quy trình điều chế và dược phẩm chứa chúng, để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virus.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế liên quan đến việc sử dụng hợp chất 2-aminopyrimidin trong điều trị bệnh nhiễm virus, 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). Thụ thể giống Toll là protein xuyên màng sơ cấp 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 tác nhân gây 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 tác nhân gây bệnh lạ kích hoạt quá trình sản xuất cytokin và điều tiết tăng các phân tử đồng kích thích trên các tế bào thực bào. Điều này giúp điều biến hoạt động của các tế bào T.

Ước tính rằng phần lớn các loài động vật có vú đều có từ 10 đến 15 loại thụ thể giống Toll. Mười ba TLR (được gọi 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 tìm thấy ở các loài động vật có vú khác. Tuy nhiên, các dạng tương đương của TLR nhất định được tìm thấy ở người thì không có mặt ở tất cả các loài 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 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 cũng 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 với các động vật có vú, minh chứng là TLR14 được tìm 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 thử nghiệm về tính miễn dịch bẩm sinh ở người.

Tổng quan về các TLR 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 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.

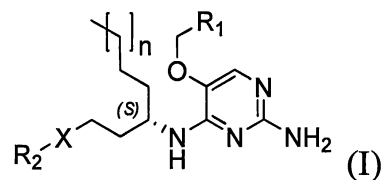
Tình trạng kỹ thuật bao gồm WO 2012/136834, đề cập đến hợp chất pyrimidin và việc sử dụng chúng để điều trị bệnh nhiễm virus. Hợp chất được bộc lộ có mạch bên alkylamin, alkenylamin, alkynylamin hoặc alkoxyamin.

Tình trạng kỹ thuật khác về hợp chất pyrimidin có mạch bên alkylamin hoặc alkoxyamin là WO 2010/133885. Hợp chất nêu trong tài liệu này được thể hiện là để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư.

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



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

X là S, S=O hoặc O=S=O,

R₁ là hydro, (C₁₋₆)-alkyl, (C₁₋₆)-alkoxy hoặc aryl,

R₂ là (C₁₋₃)-alkyl hoặc (C₃₋₆)-xycloalkyl, và

n = 1 hoặc 2.

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, chất hỗ biến, dạng 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, chất hỗ biến, dạng 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, chất hỗ biến, dạng đồng phân lập thể hoặc chất đa hình được dụng của nó có thể được sử dụng làm thuốc.

Khía cạnh khác của sáng chế là hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat, chất hỗ biến, dạng 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, chất hỗ biến, dạng đồng phân lập thể hoặc chất đa hình được dụng của nó có thể được sử dụng để điều trị rối loạn có liên quan đến quá trình điều biến TLR, cụ thể hơn là TLR7 và/hoặc TLR8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “(C₁₋₆)-alkyl” hoặc “(C₁₋₃)-alkyl” chỉ hydrocacbon béo no mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng có số lượng nguyên tử cacbon xác định.

Thuật ngữ “aryl” chỉ cấu trúc vòng thơm tùy ý có 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 4, 5, 6 hoặc 7 nguyên tử vòng. Cụ thể, cấu trúc vòng thơm này có thể có 5 hoặc 6 nguyên tử vòng.

Thuật ngữ “(C₁₋₆)-alkoxy” chỉ nhóm alkyl (mạch cacbon và hydro) được liên kết đơn với oxy, ví dụ như nhóm metoxy hoặc nhóm etoxy.

Thuật ngữ “(C₃₋₆)-xycloalkyl” chỉ vòng cacbon có số lượng nguyên tử cacbon xác định.

Trong bản mô tả này, công thức hóa học bất kỳ có 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 là 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 có thể có.

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

Sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân lập thể của 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 của cặp chất đồng phân đối ảnh theo tỉ lệ 1:1 là hỗn hợp raxemic hoặc raxemat.

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 dạng 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 các hỗn hợp của chúng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Cấu hình tuyệt đối được quy định 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 chưa 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 chưa biết có thể được quy định bằng (+) hoặc (-) tùy thuộc vào chiều mà chúng quay ánh sáng phân cực phẳng.

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%, tốt hơn là nhỏ hơn 20%, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10%, thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 5%, đặc biệt là nhỏ hơn 2% và tốt nhất là nhỏ hơn 1%, các chất đồng phân lập thể 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 nó. 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 chưa được solvat hóa. Thuật ngữ “solvat” được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả phức chất phân tử 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. Ví dụ, chúng có thể được thu nhận 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. Hợp chất này có thể được sử dụng ở dạng riêng rẽ 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 dưới 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 động 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 nó 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 dạng dược phẩm thường được sử dụng cho các thuốc dùng 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 hoạt chất, 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, đường trực tràng hoặc qua da. Ví dụ, để bào chế dược phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, có thể sử dụng môi trường bất kỳ trong số các môi trường dược dụng thông thường, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và dạng tương tự 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 và dạng tương tự đối với các trường hợp được 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 các trường hợp này, các chất mang rắn được dùng 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 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 gây ra tác động 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 dụng 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, thuốc chấm (spot-on), thuốc mỡ. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng bằng cách xông hít hoặc bơm truyền theo các phương pháp và dạng chế 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 tiện nếu bào chế dược phẩm nêu trên ở dạng liều đơn vị để dễ sử dụng và đồng đều về liều lượng. Dạng liều đơn vị 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 hoạt chất xác định được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị bệnh mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết. Ví dụ về các dạng liều đơn vị này là viên nén (bao gồm viên nén có rãnh hoặc viên nén 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.

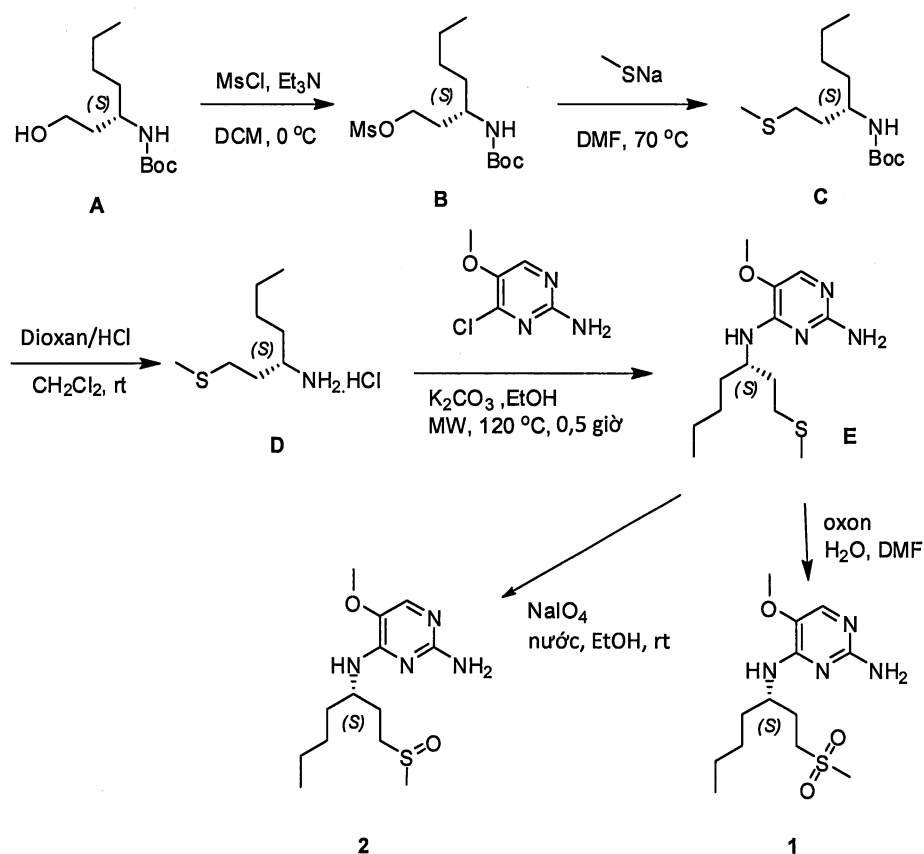
Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực điều trị bệnh lây nhiễm sẽ có khả năng xác định lượng hữu hiệu từ các kết quả thử nghiệm được thể hiện dưới đây. Nhìn chung, lượng hữu hiệu hằng ngày sẽ thường nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg thể trọng, tốt hơn là từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg thể trọng. 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 1 đến 1000 mg, và cụ thể là 5 đến 200 mg hoạt chất 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 cụ thể được điều trị, mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh cần 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 này có thể đang dùng, như đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, hiển nhiên là lượng hữu hiệu có thể được giảm đi hoặc được tăng lên tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào đánh giá của bác sĩ kê đơn hợp chất theo sáng chế. Do đó, khoảng trị số của lượng hữu hiệu nêu trên chỉ nhằm cung cấp hướng dẫn và không nhằm giới hạn phạm vi hoặc ứng dụng của sáng chế.

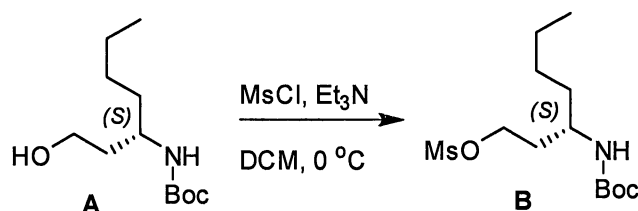
Điều chế hợp chất có công thức (I)

Sơ đồ tổng quát

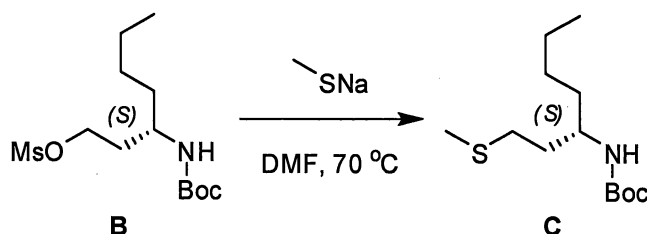
Hợp chất A được điều chế theo các phương pháp được mô tả trong WO2008147697 và WO2009067081.



Ví dụ thực hiện sáng chế

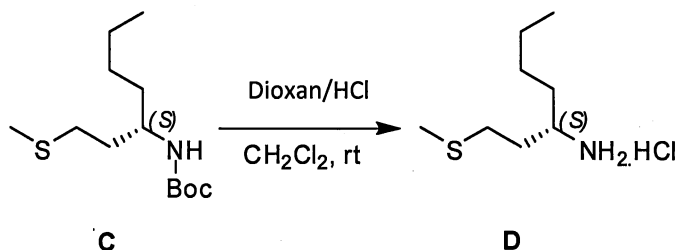


Triethylamin (10,5 g, 103,75 mmol, 2,4 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất A (10 g, 43,23 mmol, 1 đương lượng) trong CH_2Cl_2 (200 mL) ở 0°C . Metansulfonyl clorua (6,4 g, 55,87 mmol, 1,3 đương lượng) được bổ sung từng giọt vào dung dịch này và được khuấy trong 1,5 giờ ở 0°C . CH_2Cl_2 (500 mL) được bổ sung. Dung dịch này được rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 , nước muối, và được làm khô trên Na_2SO_4 , chất rắn được lấy ra bằng cách lọc và dung môi trong dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được hợp chất B. Hợp chất này được dùng nguyên trạng mà không cần tinh chế thêm.

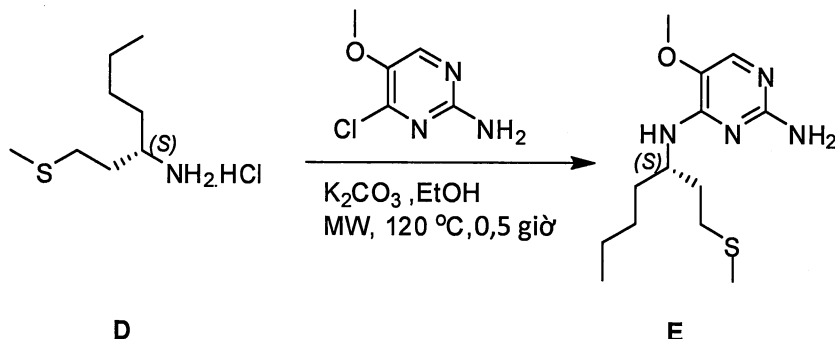


Hỗn hợp chứa hợp chất B (12 g, 38,782 mmol, 1 đương lượng) và natri thiometoxit (4,08 g, 58,17 mmol, 1,5 đương lượng) trong DMF (60 mL) được khuấy qua đêm ở 70°C . Chất rắn được lấy ra bằng cách lọc và dung môi trong dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần thô được hòa tan trong etyl axetat, được rửa bằng nước, nước muối, được làm khô trên Na_2SO_4 , chất rắn được lấy ra bằng cách lọc và dung môi trong dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột silicagel (dung môi rửa giải: ete dầu mỏ / etyl axetat từ 40/1 đến 3/1) để thu được hợp chất C.

^1H NMR (400 MHz, clorofom-d) δ ppm 0,70 - 0,85 (m, 5 H), 1,15 - 1,49 (m, 13 H), 1,49 - 1,61 (m, 1 H), 1,61 - 1,80 (m, 1 H), 2,05 (s, 3 H), 2,38 - 2,50 (m, 2 H), 3,51 (br. s., 1 H), 4,25 (br. s., 1 H)

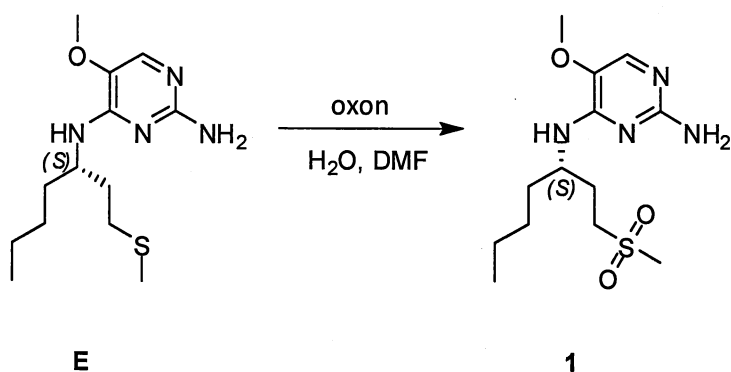


HCl/dioxan (47 mL, 187,43 mmol, 10 đương lượng) được bổ sung từng giọt vào dung dịch đã khuấy chứa hợp chất C (4,9 g, 18,74 mmol, 1 đương lượng) trong CH_2Cl_2 ở 0°C , và được khuấy trong 1 giờ ở 25°C . Dung dịch được cô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất D. Hợp chất này được dùng nguyên trạng trong bước tiếp theo.



Hợp chất D (0,75 g, 3,79 mmol, 1 đương lượng), 2-amino-4-clo-5-metoxypyrimidin (0,908 g, 5,69 mmol, 1,5 đương lượng) và K_2CO_3 (1,57 g, 11,38 mmol, 3 đương lượng) được trộn trong etanol (20 mL). Hỗn hợp này được khuấy ở 120°C trong lò vi sóng trong 30 phút. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng silic oxit kiểu điều chế (dung môi rửa giải: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 20:1$) để thu được hợp chất E.

^1H NMR (400 MHz, clorofom-d) δ ppm 1,05 - 1,15 (m, 3 H), 1,40 - 1,60 (m, 4 H), 1,95 (m, 2H), 2,15 (m, 1 H), 2,30 (d, 3 H), 2,70 (t, 1 H), 2,90 (t, 1 H), 3,55 (m, 1 H), 4,50 (m, 1 H), 3,95 (s, 3 H), 6,20 (d, 1H), 6,60 (br. s., 2 H), 7,45 (s, 1 H)

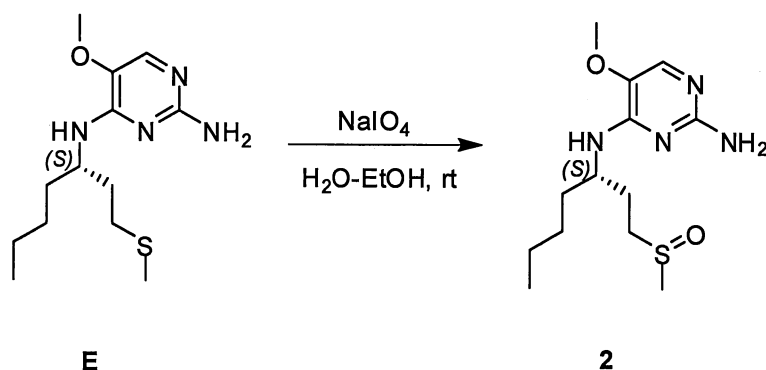


Oxon (6,959 g, 11,32 mmol, 3 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch E (1,45 g, 3,773 mmol, 1 đương lượng) trong DMF (100 mL) và nước (100 mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 12 giờ ở 20°C . Chất rắn được lấy ra bằng cách lọc và dịch lọc được bazơ hóa đến độ pH=8 bằng dung dịch nước Na_2CO_3 bão hòa. Hỗn hợp thu được được cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao kiểu điều chế

(cột: gemini 150 x 30 mm x 5 μ m, C18, pha động: CH₃CN/nước (0,05% HCl), gradien: 2 - 32% CH₃CN, 0 - 8 phút, lưu lượng: 30 mL/phút). Các phân đoạn tốt nhất được gộp lại và được cô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất 1.

LC-MS 3,88 phút

¹H NMR (400 MHz, metanol-d₄) δ ppm 0,92 (t, J=6,9 Hz, 3 H), 1,21 - 1,50 (m, 4 H), 1,69 (q, J=7,1 Hz, 2 H), 1,95 - 2,28 (m, 2 H), 2,98 (s, 3 H), 3,09 - 3,22 (m, 2 H), 3,87 (s, 3 H), 4,37 - 4,55 (m, 1 H), 7,26 (s, 1 H), không quan sát được các proton không ổn định.



Dung dịch chứa hợp chất E (40 mg, 0,14 mmol, 1 đương lượng) trong ethanol (40 mL) được xử lý bằng dung dịch chứa NaIO₄ (0,2 g, 1 mmol, 7,5 đương lượng) trong nước (10 mL), và sau đó được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Dung dịch này được cô trong chân không. Phần cặn được pha loãng bằng nước và được chiết bằng ethyl axetat. Các lớp hữu cơ gộp lại được rửa bằng nước muối, được làm khô trên Na₂SO₄, chất rắn được lấy ra bằng cách lọc, và dung môi trong dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao kiểu điều chế (cột C18, dung môi rửa giải: CH₃CN, H₂O từ 3/97 đến 33/67, 0,05% HCl). Các phân đoạn mong muốn được thu lại và được cô trong chân không để thu được hợp chất 2.

LC-MS 3,78 phút

¹H NMR (400 MHz, metanol-d₄) δ ppm 0,90 (t, J=6,8 Hz, 3 H), 1,19 - 1,49 (m, 4 H), 1,67 (d, J=6,5 Hz, 2 H), 1,91 - 2,15 (m, 2 H), 2,63 (br. s., 3 H), 2,69 - 2,96 (m, 2 H), 3,85 (s, 3 H), 4,46 (br. s., 1 H), 7,25 (s, 1 H), không quan sát được các proton không ổn định.

Phương pháp phân tích LC-MS

Cột	YMC-PACK ODS-AQ, 50 x 2,0 mm, 5 μ m		
Pha động	A:H ₂ O (0,1% TFA)		
	B:axetonitril (0,05% TFA)		
	Thời gian (phút)	A%	B%
	0	100	0
	1	100	0
	5	40	60
	7,5	40	60
	8	100	0
Lưu lượng	0,8 mL/phút		
Bước sóng	UV 220 nm		
Nhiệt độ cột	50°C		
Độ phân cực MS	Dương tính		
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 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 đã chuyển nhiễm tạm thời với vector 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 2 mM). Để chuyển nhiễm các tế bào trong các đĩa loại 15 cm, các tế bào được tách ra bằng Trypsin-EDTA, được chuyển nhiễm với hỗn hợp chứa CMV-TLR7 hoặc TLR8 plasmid (1700 ng), NF κ B-luc plasmid (850 ng) và chất phản ứng chuyển nhiễm và được ủ trong 48 giờ ở 37°C trong môi trường khí CO₂ đã làm ẩm 5%. Sau đó, các tế bào đã 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 sẵn 200 nL hợp chất trong DMSO 100%. Sau 6 giờ ủ 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 xây dựng dựa trên 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 đồng thời bằng cách sử dụng dây pha loăng tương tự của hợp chất với 40 μL tế bào đã 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 6 giờ ủ ở 37°C , CO_2 5% bằng cách thêm 15 μL 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 CC_{50} ,

Đồng thời, dây pha loăng tương tự của hợp chất được sử dụng (200 nL hợp chất trong DMSO 100%) với 40 μL tế bào đã 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 6 giờ ủ ở 37°C , CO_2 5%, hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách thêm 15 μL cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và đọc 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 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 đã 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 hợp chất (tổng thể tích là 70 μL). Sau khi ủ qua đêm, 10 μL dịch nổi bề mặt được chuyển sang các đĩa loại 384 lỗ chứa 5×10^3 tế bào HEK-ISREluc/lỗ trong 30 μL (được cấy vào đĩa vào ngày trước đó). Sau 24 giờ ủ, 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. 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.

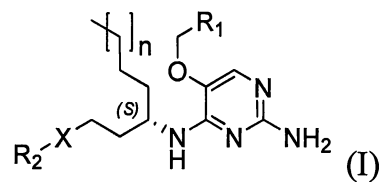
Bảng I: Hoạt tính sinh học.

Số	TLR7 của người (LEC) μ M	TLR8 của người (LEC) μ M	HEK-ISRE luc (LEC) μ M
1	2,0	1,7	0,65
2	1,4	9,2	4,8
E	3,9	10	Không xác định

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



hoặc muối, chất hồ biến, dạng đồng phân lập thể, solvat hoặc chất đa hình được dụng của nó, trong đó:

X là S, S=O hoặc O=S=O,

R₁ là hydro, (C₁₋₆)-alkyl, (C₁₋₆)-alkoxy hoặc aryl,

R₂ là (C₁₋₃)-alkyl hoặc (C₃₋₆)-xycloalkyl, và

n = 1 hoặc 2.

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