



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)

(11)



CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

1-0022947

(51)⁷ C07D 487/04, A61K 31/519, A61P 31/12

(13) B

(21) 1-2015-04891

(22) 26.06.2014

(86) PCT/EP2014/063467 26.06.2014

(87) WO2014/207082 31.12.2014

(30) 13174108.4 27.06.2013 EP

(45) 25.02.2020 383

(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), PIETERS, Serge Maria Aloysius (NL), LAST, Stefaan Julien (BE), EMBRECHTS, Werner (BE), 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 PYROLO [3,2-D] PYRIMIDIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ ĐỂ ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH NHIỄM VIRUT

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrolo[3,2-d]pyrimidin, quy trình điều chế, dược phẩm để điều trị và /hoặc trị liệu các bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrolo[3,2-*d*]pyrimidin, quy trình điều chế, được phẩm để điều trị và /hoặc trị liệu các bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất pyrolo[3,2-*d*]pyrimidin, cụ thể hơn là việc sử dụng hợp chất pyrolo[3,2-*d*]pyrimidin trong điều trị các bệnh nhiễm virus, rối loạn miễn dịch hoặc gây viêm, nhờ đó bao gồm cả sự điều biến, hoặc tương tác, của các thụ thể giống Toll (toll-like-receptors - TLRs). Thụ thể giống Toll là protein xuyên màng bậc một được đặc trưng bởi miền giàu leuxin ngoại bào và miền mở rộng bào chất chứa vùng bảo toàn. Hệ miễn dịch bẩm sinh có thể nhận biết các mẫu phân tử có liên quan đến mầm bệnh thông qua các TLR này được biểu hiện trên bề mặt tế bào của một số loại tế bào miễn dịch nhất định. Việc nhận biết các mầm bệnh ngoại lai làm hoạt hóa sự sản xuất các xytokin và điều hòa tăng các phân tử đồng kích thích trên các thực bào. Điều này dẫn đến sự điều biến đặc tính tế bào T.

Hầu hết các loài động vật có vú có từ mười đến mười lăm loại thụ thể giống Toll. Mười ba TLR (được đặt tên từ TLR1 đến TLR13) đều đã được nhận diện ở người và chuột, và các dạng tương đương của nhiều TLR đã được tìm thấy ở các loài động vật có vú khác. Tuy nhiên, các dạng tương đương của một số TLR nhất định tìm thấy ở người lại không có mặt ở tất cả các động vật có vú. Ví dụ, gen ghi mã cho protein cùng chức năng với TLR10 ở người có mặt ở chuột nhắt, nhưng dường như đã bị retrovirus làm tổn thương ở một số thời điểm trong quá khứ. Mặt khác, chuột biểu hiện TLR 11, 12, và 13, nhưng không có TLR nào trong số này được biểu hiện ở người. Các động vật có vú khác có thể biểu hiện các TLR không được tìm thấy ở người. Các loài không phải động vật có vú khác có thể có các TLR khác với động vật có vú, như TLR14, một TLR được tìm thấy trong cá xem sao Takifugu. Điều này có thể làm phức tạp hóa quy trình sử dụng động vật thử nghiệm làm mẫu của miễn dịch bẩm sinh ở người.

Xem tổng quan về thụ thể giống Toll trong các bài báo sau. Hoffmann, J.A., Nature, 426, p33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T., Annual Rev. Immunology, 21, p335-376, 2003; Ulevitch, R. J., Nature Reviews: Immunology, 4, p512-520, 2004.

Hợp chất có hoạt tính trên thụ thể giống Toll đã được mô tả trước đó như các dẫn xuất dị vòng ở WO2000/006577, dẫn xuất adenin ở WO98/01448 và WO99/28321 và pyrimidin ở WO2009/067081.

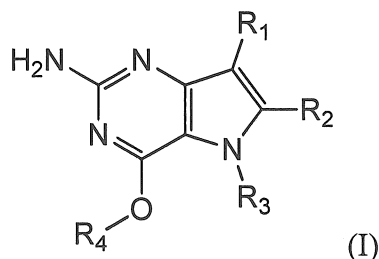
Trong quá trình điều trị các bệnh nhiễm virus nhất định, việc tiêm điều đặn interferon (IFN-alfa) có thể dùng, như trường hợp với virus viêm gan C (hepatitis C virus - HCV). Tác nhân gây cảm ứng IFN dạng phân tử nhỏ có thể dùng qua đường miệng đưa ra ưu điểm tiềm năng của tính sinh miễn dịch giảm và thời gian thích hợp sử dụng. Do đó, tác nhân gây cảm ứng IFN mới là lớp thuốc mới hiệu quả tiềm năng để điều trị các bệnh nhiễm virus. Ví dụ trong các tài liệu về tác nhân gây cảm ứng IFN dạng phân tử nhỏ có hiệu quả kháng virus xem De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P. *Science* 1978, 200, 563-565.

Interferon α cũng được dùng cho bệnh nhân kết hợp với các thuốc khác trong quá trình điều trị của các loại ung thư nhất định. Chất chủ vận TLR 7/8 cũng quan tâm làm chất điều chỉnh vắc xin vì khả năng cảm ứng đáp ứng Th1 rõ ràng của chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tuy nhiên, hiện có nhu cầu mạnh với chất điều biến thụ thể giống Toll mới có tính chọn lọc được ưu tiên, và profin an toàn được cải thiện so sánh với hợp chất đã có trong lĩnh vực.

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



và muối được dụng của chúng, solvat hoặc dạng đa hình của chúng trong đó:

R₁ là H, flo hoặc metyl;

R₂ là H, halogen hoặc C₁₋₃ alkyl;

R₃ là C₁₋₆ alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thay thế độc lập được chọn từ aryloxy, dị vòng, halogen, aryl, alkylamino, dialkylamino, C₁₋₆ alkyl, axit carboxylic, carboxylic este, amit của axit carboxylic, nitril hoặc C₁₋₆ alkoxy;

hoặc trong đó:

R₃ là alkylaryl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thay thế độc lập được chọn từ halogen, aryloxy, aryl, alkylamino, dialkylamino, C₁₋₆ alkyl, axit carboxylic, carboxylic este, amit của axit carboxylic, sulfonamit, nitril hoặc C₁₋₆ alkoxy;

R₄ là C₁₋₆ alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thay thế độc lập được chọn từ hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₃₋₇ xycloalkyl, C₂₋₆ alkenyl hoặc aryl còn tùy ý được thế bằng C₁₋₆ alkyl và C₃₋₇ xycloalkyl còn tùy ý được thế bằng C₁₋₆ alkyl;

hoặc trong đó:

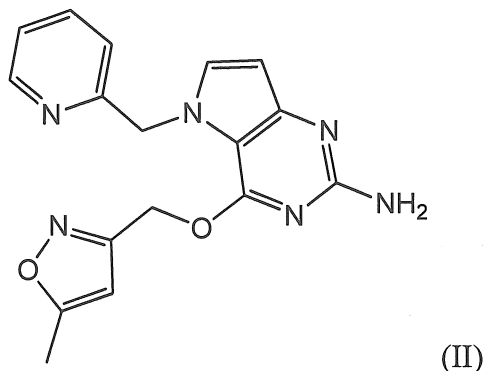
R₄ là alkylaryl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thay thế độc lập được chọn từ halogen, aryloxy, aryl, alkylamino, dialkylamino, C₁₋₆ alkyl, axit carboxylic, carboxylic este, amit của axit carboxylic, sulfonamit, nitril hoặc C₁₋₆ alkoxy.

Hợp chất được ưu tiên là hợp chất có công thức (I) trong đó R₃ là nhóm CH₂-aryl (được thế hoặc không thế) và R₁, R₂, và R₄ được mô tả như trên.

Theo phương án thứ hai sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) trong đó R₃ và R₄ cùng là nhóm CH₂-aryl còn tùy ý được thế như được mô tả ở trên và R₁ và R₂ như được mô tả ở trên.

Các phương án được ưu tiên khác là các hợp chất có công thức (I) trong đó R₁ là flo, R₂ là hydro và R₃ và R₄ được mô tả như trên.

Hợp chất được ưu tiên nhất là hợp chất có công thức (II) có cấu trúc hóa học dưới đây:



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

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

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc (II) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của chúng, hoặc dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc (II) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của chúng có thể được sử dụng theo đó trong điều trị rối loạn bất kỳ có liên quan đến sự điều biến TLR7.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “alkyl” chỉ hydrocacbon béo bão hòa mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa số nguyên tử cacbon chỉ định.

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

Thuật ngữ “alkylaryl” chỉ hydrocacbon béo bão hòa mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa số nguyên tử cacbon chỉ định được thế bằng aryl, trong đó “aryl” được định nghĩa như dưới đây.

Thuật ngữ “alkenyl” chỉ alkyl như được định nghĩa ở trên gồm ít nhất hai nguyên tử cacbon và ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon.

Thuật ngữ “xycloalkyl” chỉ vòng cacbon chứa số nguyên tử cacbon chỉ định.

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

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

Thuật ngữ “aryloxy” chỉ cấu trúc nhân thơm. Nhóm thơm này được liên kết đơn với oxy.

Thuật ngữ “dị vòng” chỉ phân tử bão hòa hoặc bão hòa một phần và gồm tetrahydrofuran, dioxan hoặc các ete vòng khác. Dị vòng chứa nguyên tử nitơ bao gồm, ví dụ azetidin, morpholin, piperidin, piperazin, pyrrolidin và các vòng tương tự. Các dị vòng khác gồm, ví dụ, thiomorpholin, dioxolinyll và sulfon vòng.

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

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

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

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng là sản phẩm tinh thể hoặc vô định hình. Chúng có thể thu được ví dụ như đẽm rắn, bột, hoặc màng bằng các phương pháp như kết tủa, kết tinh, sấy khô nhiệt độ thấp, sấy khô kiểu phun, hoặc sấy khô kiểu bốc hơi. Chúng có thể được dùng riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất khác theo sáng chế hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Nói chung, chúng sẽ được dùng như 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 khác với (các) hợp chất theo sáng chế. Sự lựa chọn tá dược phụ thuộc lớn vào các yếu tố như cách sử dụng cụ thể, hiệu quả của tá dược với độ tan và độ ổn định, và đặc tính của dạng liều.

Hợp chất theo sáng chế hoặc phân nhóm bất kỳ của chúng có thể được tạo thành các dạng dược phẩm khác nhau tùy mục đích sử dụng. Tất cả chế phẩm thường được sử dụng cho thuốc sử dụng toàn thân có thể được nêu làm chế phẩm thích hợp. Để điều chế dược phẩm theo sáng chế, lượng hiệu quả của hợp chất cụ thể, tùy ý ở dạng muối cộng, khi hoạt chất kết hợp trong hỗn hợp trộn kỹ với chất mang dược dụng, chất mang này có thể có nhiều dạng phụ thuộc vào dạng chế phẩm mong muốn sử dụng. Các dược phẩm này được mong muốn ở một đơn vị dạng liều thích hợp, ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, trực tràng hoặc qua da. Ví dụ, để điều chế chế phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, bất kỳ môi trường dược phẩm thông thường có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và các chất tương tự trong trường hợp là các chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như dịch huyền phù, siro, cốm ngọt, nhũ tương và các dung dịch; hoặc chất mang rắn như tinh bột, đường, cao lanh, chất pha loãng, chất bôi trơn, chất liên kết, chất phân hủy và các chất tương tự trong trường hợp là bột, viên tròn, viên nang, và thuốc phiến. Vì sự dễ dàng khi sử dụng của chúng, thuốc phiến và viên nang đại diện cho dạng đơn vị liều dùng qua đường miệng có lợi nhất, trong trường hợp chất mang dược phẩm dạng rắn rõ ràng được sử dụng. Cũng được bao gồm là các chế phẩm dạng rắn có thể chuyển hóa thành dạng lỏng không lâu trước khi sử dụng. Ở chế phẩm thích hợp để sử dụng qua da, chất mang chứa chất tăng cường độ thấm và/hoặc chất thấm ướt thích hợp tùy ý, kết hợp tùy ý với chất phụ gia thích hợp có đặc tính bất kỳ theo tỷ lệ nhỏ, chất phụ gia này không gây ra tác động có hại đáng kể lên da. Chất phụ gia nêu trên có thể tạo thuận lợi cho việc sử dụng trên da

và/hoặc có thể có ích để điều chế chế phẩm mong muốn. Các chế phẩm này có thể dùng theo các cách khác nhau, ví dụ, là miếng dán qua da, là giọt, là thuốc bôi dỏ. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng qua xông hoặc bơm theo phương pháp và chế phẩm được sử dụng trong lĩnh vực để sử dụng bằng cách này. Vì vậy, nói chung hợp chất theo sáng chế có thể được dùng cho phổi ở dạng dung dịch, huyền phù hoặc bột khô.

Bào chế được phẩm nêu trên ở dạng liều đơn vị đặc biệt có lợi để dễ sử dụng và liều đồng nhất. Dạng liều đơn vị như được dùng trong bản mô tả này chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp làm các liều một đơn vị, mỗi đơn vị chứa số lượng hoạt chất xác định tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị bệnh mong muốn khi kết hợp với chất mang được phẩm cần thiết. Các ví dụ về các dạng liều đơn vị này là thuốc phiến (bao gồm thuốc phiến có khía hoặc phủ), viên nang, viên tròn, gói bột, viên nhện, thuốc đạn, dung dịch tiêm hoặc dịch huyền phù và tương tự và tổ hợp đã phân ly của chúng.

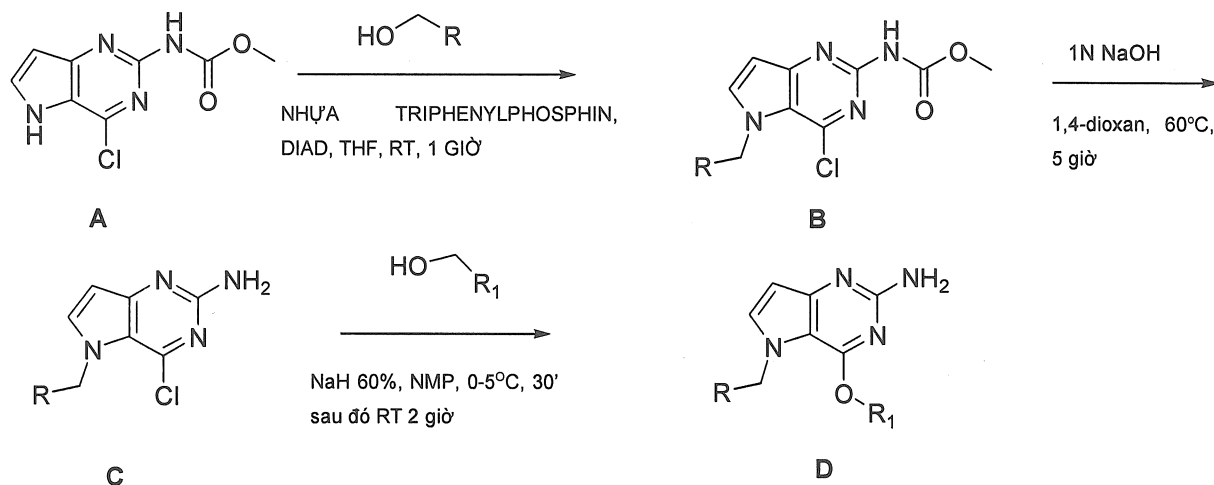
Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật điều trị bệnh nhiễm trùng sẽ có thể xác định lượng hữu hiệu từ kết quả thử nghiệm được đưa ra sau đây trong bản mô tả này. Thông thường liều hàng ngày hiệu quả được dự tính sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg thể trọng. Có thể thích hợp nếu sử dụng liều yêu cầu dưới dạng hai, ba, bốn liều phụ hoặc nhiều hơn ở các khoảng thời gian thích hợp trong ngày. Các liều phụ này có thể được phối trộn dưới dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa 1 đến 1000 mg, và cụ thể là 5 đến 200 mg thành phần hoạt tính cho mỗi dạng liều đơn vị.

Liều lượng và tần số sử dụng chính xác sẽ tùy 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 được điều trị, độ tuổi, cân nặng và tình trạng sinh lý chung của bệnh nhân cụ thể cũng như các thuốc khác mà cá thể có thể đang dùng, như đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, rõ ràng là lượng hữu hiệu có thể được giảm hoặc tăng tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng điều trị và/hoặc tùy thuộc vào đánh giá của bác sĩ kê đơn hợp chất theo sáng chế. Do đó, lượng

hữu hiệu nằm trong khoảng đã nêu trên đây chỉ là hướng dẫn và không dự định làm giới hạn phạm vi hoặc sử dụng sáng chế ở mức độ bất kỳ.

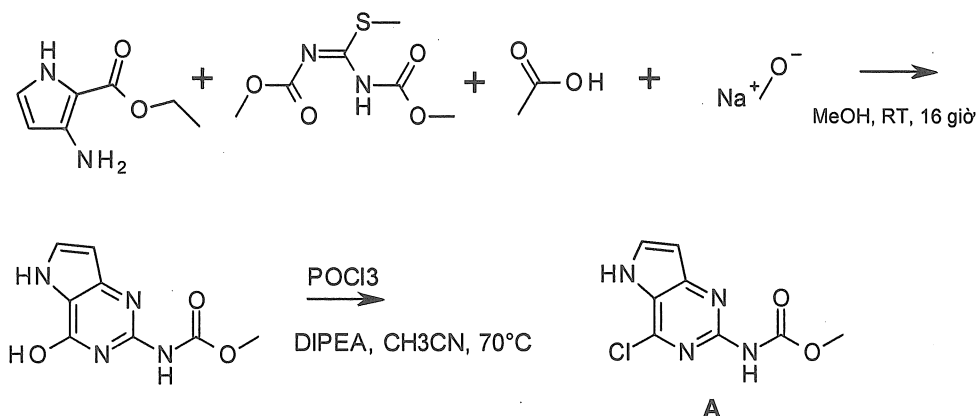
Ví dụ thực hiện sáng chế

Sơ đồ 1. Sơ đồ phản ứng



Hợp chất dạng A ở sơ đồ 1 có thể chức hóa với rượu sử dụng điều kiện Mitsunobu trong dung môi không proton phân cực, ví dụ THF. Sự phân cắt methyl carbamat được thực hiện ở môi trường kiềm trong 1,4-dioxan để tạo thành sản phẩm trung gian C. Sự dịch chuyển của clo trong C được thực hiện với rượu và bazơ (ví dụ NaH) trong dung môi không proton phân cực (ví dụ NMP) để tạo thành hợp chất có dạng D.

Điều chế sản phẩm trung gian A



3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol hydroclorua (25,8g, 135,3mmol) được phân bố giữa diclometan và muối NaHCO_3 . Lốp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 , chất rắn được loại bỏ nhờ lọc, và dung môi của nước lọc làm bay hơi đến khô. Phần còn lại được hòa tan trong metanol (500ml) cùng với 1,3-bis(metoxycacbonyl)-2-metyl-2-thiopseudoure (32,1g, 156mmol) và axit axetic (39ml, 677mmol) và khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Chất kết tủa xuất hiện và khuấy liên tục qua đêm. Natri metoxit (73,1g, 1353mmol) được thêm vào. Phản ứng phát nhiệt quan sát được và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm. Hỗn hợp được đưa lên độ pH 5 bằng axit axetic và chất kết tủa được phân lập bằng cách lọc, được nghiền thành bột trên thiết bị lọc bằng nước (2 x 350ml), axetonitril (350ml) và diisopropyl ete (350ml). Metyl N-(4-hydroxy-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-2-yl)carbamate thu được được sấy trong lò.

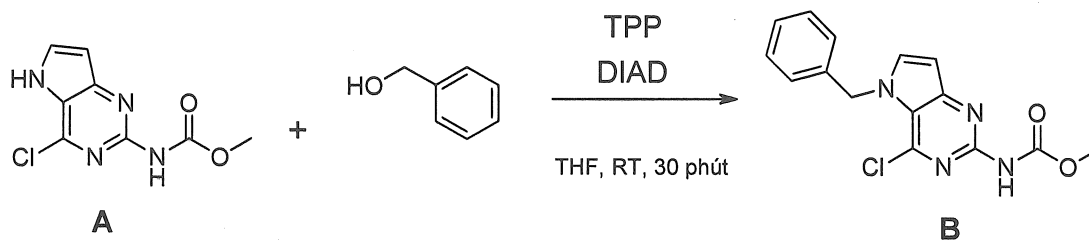
Metyl N-(4-hydroxy-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-2-yl)carbamate (25g, 120mmol) được pha chế trong 350ml axetonitril trong bình đa cổ 500ml được lắp máy khuấy trên cao (300 vòng/phút) ở nhiệt độ phòng. POCl_3 (22,1ml, 238,2mmol) được thêm vào và sau đó hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt đến 70°C trong khi khuấy. Diisopropyletylamin (41,4ml, 240,2mmol) được thêm vào từng giọt bằng bơm tiêm với tốc độ 0,2ml/phút.

Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh về nhiệt độ phòng và rót vào dung dịch khuấy có natri axetat (78,8g, 961mmol) trong nước (500ml) ở 45°C . Chất hữu cơ được làm bay hơi và chất lỏng còn lại được khuấy và được làm lạnh trên bề đá. Chất rắn tạo ra được phân lập bằng cách lọc, rửa bằng axetonitril và được nghiền thành bột với

diisopropyl ete để cho sản phẩm trung gian A, được sấy trong chân không. LC-MS $m/z = 227$ (M+H)

Điều chế sản phẩm trung gian B

Phương pháp 1.

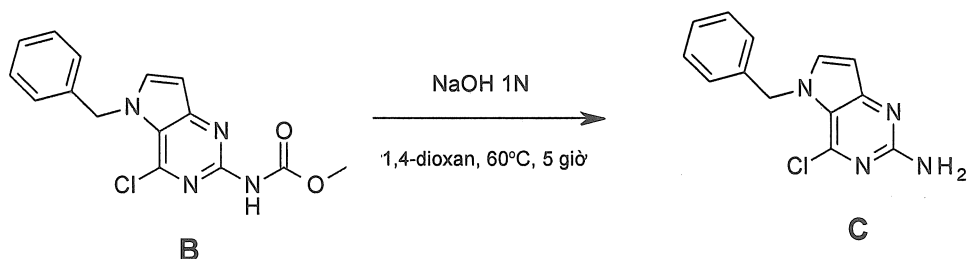


Huyền phù chứa A (500mg, 2,2mmol), rượu benzylic (0,28ml, 2,6mmol) và triphenylphosphin (0,69g, 2,6mmol) trong THF khan (15ml) được thêm DIAD (0,64ml, 3,3mmol) vào ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm được tinh chế bằng phép sắc ký cột silicagel sử dụng heptan với gradien etyl axetat; 100-0 đến 90-10. Phần chiết sản phẩm được tập hợp lại và được cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm được nghiền thành bột trong diisopropyl ete, được phân lập bằng cách lọc và được sấy trong chân không để cho B là chất rắn màu vàng nhạt. LC-MS $m/z = 317$ (M+H)

Phương pháp 2 với nhựa liên kết triphenylphosphin.

Huyền phù chứa A (700mg, 3,1mmol), rượu benzylic (0,39ml, 3,7mmol) và nhựa triphenylphosphin (2,6g, 7,7mmol) trong THF khan (21ml) được thêm DIAD (0,90ml, 4,6mmol) vào ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp được lọc qua decalit đóng gói và rửa bằng metanol. Nước lọc được cô trong chân không. Sản phẩm được nghiền thành bột trong diisopropyl ete, được phân lập bằng cách lọc và được sấy theo chân không để cho chất rắn màu vàng nhạt, B. LC-MS $m/z = 317$ (M+H)

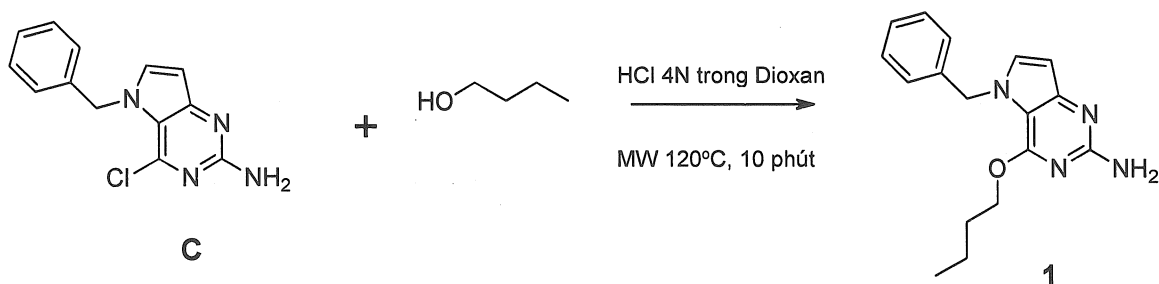
Điều chế sản phẩm trung gian C



B (738 mg, 2,3 mmol) được hòa tan trong 1,4-dioxan (11 ml) trong ống thủy tinh 50 ml và NaOH (5,6 ml, 1N a.q.) được thêm vào. Hỗn hợp được gia nhiệt đến 60°C trong 5 giờ. Hỗn hợp này được làm lạnh và được cô trong chân không. Sản phẩm dư được xử lý bằng nước và chất kết tủa được phân lập bằng cách lọc và được sấy trong chân không để cho C là chất rắn. Sản phẩm được sử dụng như ở bước tiếp theo. LC-MS $m/z = 259$ (M+H)

Điều chế 1 và 2

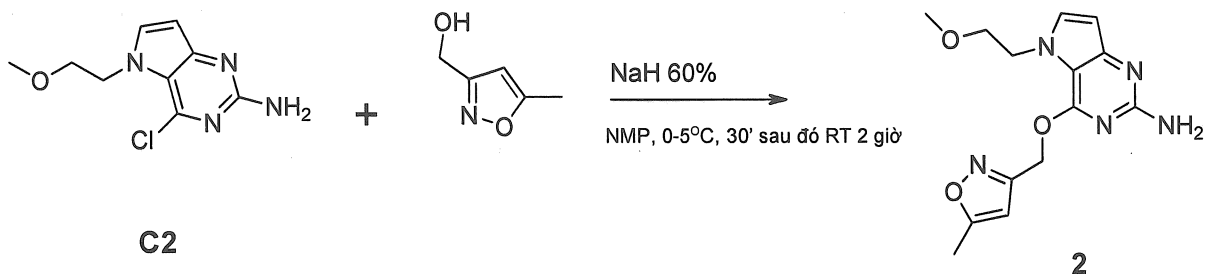
Phương pháp 1.



Sản phẩm trung gian C (240 mg, 0,93 mmol), rượu *n*-butylic (3,2 ml, 35 mmol), và HCl 4N trong dioxan (0,46 ml, 1,9 mmol) được đặt vào lọ dùng trong lò vi sóng 7 ml. Lọ này được bịt kín và hỗn hợp được gia nhiệt trong lò vi sóng ở 120°C trong 10 phút. Hỗn hợp được làm lạnh và được cô trong chân không. Sản phẩm dư được trung hòa bằng dung dịch muối NaHCO_3 và được chiết bằng diclometan. Lớp hữu cơ được tách ra, được làm khô (MgSO_4), chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và nước lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm được tinh chế qua phép sắc ký cột silicagel

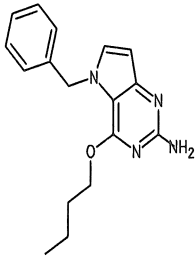
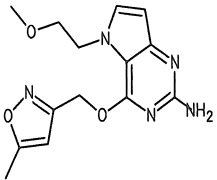
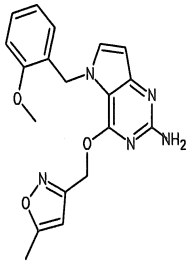
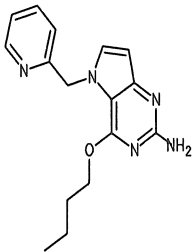
sử dụng diclometan-metanol; gradien 100-0 đến 95-5. Phân chiết tốt nhất được tập hợp lại và được cô trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm được nghiền thành bột trong diisopropyl ete và chất rắn được phân lập bằng cách lọc và được sấy trong chân không để cho 1 là chất rắn màu trắng.

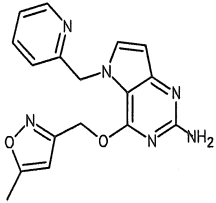
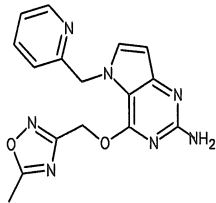
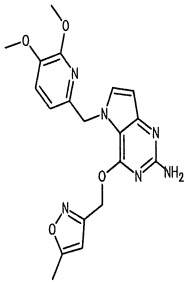
Phương pháp 2.

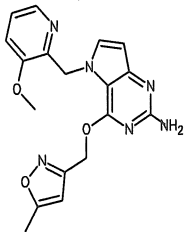
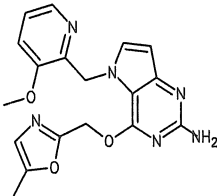
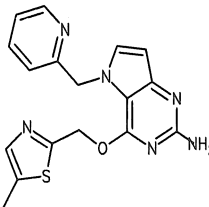
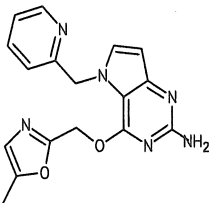


Sản phẩm trung gian C2 (250 mg, 1,1 mmol), và 3-hydroxymetyl-5-metylisoxazol (0,16 ml, 1,65 mmol) được hòa tan trong NMP (3 ml) trong lọ 7 ml. Hỗn hợp được làm lạnh trên bề đá và NaH (66 mg, 1,65 mmol, pha loãng 60% trong dầu khoáng) được thêm vào trong điều kiện N₂ và khuấy hỗn hợp ở 0-5°C trong 30 phút và sau đó cho phép làm ấm đến nhiệt độ phòng và liên tục khuấy trong 2 giờ. Sau đó hỗn hợp phản ứng chưa xử lý được tinh chế sơ bộ bằng HPLC (pha dừng: RP Vydac Denali C18 10 μm, 200 g, 5 cm), pha động: dung dịch NH₄OAc 0,25% trong nước, CH₃CN), phân chiết mong muốn được tập hợp lại và được cô trong chân không. Sản phẩm được kết tinh từ CH₃CN, được phân lập bằng cách lọc và được sấy trong chân không để cho chất rắn màu trắng, 2.

Bảng 1. Hợp chất có công thức (I) và số liệu phân tích tương ứng. Hợp chất này được điều chế theo phương pháp được mô tả ở phần ví dụ thực hiện sáng chế.

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Rt (phút)	Khối lượng LC-MS đã được tìm thấy (M+H)
1		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0,85 (t, $J=7,37$ Hz, 3 H) 1,26 (dq, $J=15,02, 7,39$ Hz, 2 H) 1,56 – 1,63 (m, 2 H) 4,30 (t, $J=6,38$ Hz, 2 H) 5,39 (s, 2 H) 5,72 (s, 2 H) 6,08 (d, $J=3,08$ Hz, 1 H) 7,03 – 7,08 (m, 2 H) 7,19 – 7,25 (m, 1 H) 7,26 – 7,32 (m, 2 H) 7,48 (d, $J=3,08$ Hz, 1 H)	B, 1,98	297
2		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,41 (d, $J=0,66$ Hz, 3 H) 3,17 (s, 3 H) 3,57 (t, $J=5,50$ Hz, 2 H) 4,29 (t, $J=5,50$ Hz, 2 H) 5,50 (s, 2 H) 5,82 (s, 2 H) 6,03 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 6,37 (d, $J=0,88$ Hz, 1 H) 7,35 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H)	A, 0,69	304
3		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,33 – 2,38 (m, 3 H) 3,79 (s, 3 H) 5,34 (s, 2 H) 5,38 (s, 2 H) 5,75 (s, 1 H) 5,86 (s, 2 H) 6,12 (d, $J=3,08$ Hz, 1 H) 6,40 – 6,47 (m, 1 H) 6,78 (td, $J=7,48, 0,66$ Hz, 1 H) 7,00 (d, $J=7,92$ Hz, 1 H) 7,24 (td, $J=7,80, 1,80$ Hz, 1 H) 7,43 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H)	B, 1,62	366
4		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0,77 (t, $J=7,4$ Hz, 3 H), 1,12 (dq, $J=15,0, 7,4$ Hz, 2 H), 1,40 – 1,50 (m, 2 H), 4,21 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H), 5,49 (s, 2 H), 5,73 6 (s, 2 H), 6,11 (d, $J=2,9$ Hz,	A, 0,81	298

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Rt (phút)	Khối lượng LC-MS đã được tìm thấy (M+H)
		1 H), 6,65 (d, J=7,9 Hz, 1 H), 7,21 – 7,28 (m, 1 H), 7,47 (d, J=3,1 Hz, 1 H), 7,69 (td, J=7,7, 1,8 Hz, 1 H), 8,47 – 8,53 (m, 1 H)		
5		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,35 (s, 3 H) 5,37 (s, 2 H) 5,47 (s, 2 H) 5,84 – 5,90 (m, 3 H) 6,14 (d, J=2,86 Hz, 1 H) 6,72 (d, J=7,92 Hz, 1 H) 7,24 (dd, J=6,93, 4,95 Hz, 1 H) 7,52 (d, J=3,08 Hz, 1 H) 7,65 (td, J=7,70, 1,76 Hz, 1 H) 8,47 (d, J=4,18 Hz, 1 H)	B, 1,29	337
6		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,57 (s, 3 H) 5,45 (s, 2 H) 5,51 (s, 2 H) 5,85 (s, 2 H) 6,13 (d, J=2,86 Hz, 1 H) 6,85 (d, J=7,70 Hz, 1 H) 7,22 (dd, J=7,04, 5,06 Hz, 1 H) 7,52 (d, J=3,08 Hz, 1 H) 7,64 (td, J=7,65, 1,65 Hz, 1 H) 8,43 (d, J=4,18 Hz, 1 H)	B, 1,14	338
7		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,36 (s, 3 H) 3,74 (s, 3 H) 3,71 (s, 3 H) 5,29 (s, 2 H) 5,40 (s, 2 H) 5,85 (s, 2 H) 5,93 (s, 1 H) 6,12 (d, J=3,08 Hz, 1 H) 6,29 (d, J=7,92 Hz, 1 H) 7,11 (d, J=7,92 Hz, 1 H) 7,50 (d, J=3,08 Hz, 1 H)	B, 1,45	397

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Rt (phút)	Khối lượng LC-MS đã được tìm thấy (M+H)
8		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,36 (s, 3 H) 3,80 (s, 3 H) 5,31 (s, 2 H) 5,48 (s, 2 H) 5,75 – 5,81 (m, 3 H) 6,07 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 7,25 (dd, $J=8,25, 4,73$ Hz, 1 H) 7,36 – 7,41 (m, 2 H) 7,90 (dd, $J=4,73, 0,99$ Hz, 1 H)	A, 0,72	367
9		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,23 (d, $J=1,10$ Hz, 3 H) 3,77 (s, 3 H) 5,32 (s, 2 H) 5,45 (s, 2 H) 5,77 (s, 2 H) 6,07 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 6,79 (d, $J=1,10$ Hz, 1 H) 7,21 (dd, $J=8,25, 4,73$ Hz, 1 H) 7,33 (dd, $J=8,36, 1,32$ Hz, 1 H) 7,37 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 7,88 (dd, $J=4,73, 1,21$ Hz, 1 H)	B, 1,26	367
10		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,34 – 2,41 (m, 3 H) 5,49 (s, 2 H) 5,58 (s, 2 H) 5,88 (s, 2 H) 6,15 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 6,72 (d, $J=7,92$ Hz, 1 H) 7,20 – 7,25 (m, 1 H) 7,43 (d, $J=1,10$ Hz, 1 H) 7,52 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 7,63 (td, $J=7,70, 1,76$ Hz, 1 H) 8,46 (dd, $J=4,73, 0,77$ Hz, 1 H)	B, 1,28	353
11		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,24 (s, 3 H) 5,39 (s, 2 H) 5,43 (s, 2 H) 5,85 (s, 2 H) 6,13 (d, $J=2,86$ Hz, 1 H) 6,76 (d, $J=7,70$ Hz, 1 H) 6,81 (s, 1 H) 7,21 (dd, $J=6,93, 5,17$ Hz, 1 H) 7,52	B, 1,18	337

#	Cấu trúc	^1H NMR	Phương pháp LC, Rt (phút)	Khối lượng LC-MS đã được tìm thấy (M+H)
		(d, J=2,86 Hz, 1 H) 7,62 (td, J=7,65, 1,43 Hz, 1 H) 8,40 – 8,45 (m, 1 H)		

Phương pháp phân tích.

Quy trình tổng LCMS

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) được thực hiện sử dụng bơm LC, mảng điốt (DAD) hoặc máy dò UV và cột như được mô tả trong phương pháp tương ứng. Nếu cần thiết, bổ sung các máy dò (xem bảng các phương pháp bên dưới).

Dòng từ cột được đưa vào khối phổ kế (Mass Spectrometer - MS) mà được cấu hình với nguồn ion áp suất không khí. Sẽ là trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để thiết lập các thông số phù hợp (ví dụ khoảng quét, thời gian dừng...) để thu được các ion cho phép sự phát hiện khối lượng phân tử (molecular weight - MW) đơn đồng vị danh nghĩa của hợp chất. Việc thu nhận dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm thích hợp.

Hợp chất được mô tả bằng thời gian lưu (retention times - Rt) thử nghiệm của chúng và các ion. Nếu không chỉ định khác trong bảng dữ liệu, ion phân tử được ghi nhận tương ứng với $[\text{M}+\text{H}]^+$ (phân tử đã thêm một proton) và/hoặc $[\text{M}-\text{H}]^-$ (phân tử đã bớt một proton). Trong trường hợp hợp chất này không có khả năng ion hóa trực tiếp dạng sản phẩm cộng được chỉ định (nghĩa là $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, v.v...). Với phân tử có nhiều mẫu đồng vị (Br, Cl.), giá trị được ghi nhận là giá trị thu được với khối lượng chất đồng vị thấp nhất. Tất cả kết quả thu được bởi tính không ổn định của thử nghiệm mà thường kết hợp với phương pháp đã sử dụng.

Sau đây, “SQD” có nghĩa là máy dò tứ cực đơn (Single Quadrupole Detector), “MSD” là máy dò khối phổ (Mass Selective Detector), “RT” là nhiệt độ trong phòng,

“BEH” là hỗn hợp lai etylsiloxan/silic oxit rỗng mạch (bridged ethylsiloxane/silica hybrid), “DAD” là máy dò mảng điốt (Diode Array Detector), “HSS” là silic oxit độ cứng cao (High Strength silica), “Q-ToF” là khối phổ kế thời gian bay tứ cực (Quadrupole Time-of-flight), “CLND” là máy dò nitơ quang hóa (Chemiluminescent Nitrogen Detector), “ELSD” là máy dò quét xạ bay hơi,

Các mã phương pháp LC-MS (dòng được biểu hiện bằng ml/phút; nhiệt độ cột (Col T) bằng °C; thời gian chạy bằng phút).

Mã phương pháp	Thiết bị đo	Cột	Pha động	Gradient	Dòng ----- Col T	Thời gian chạy
A	Nước: Acquity® UPLC® - DAD và SQD	Nước: BEH C18 (1,7µm, 2,1*50mm)	A: CH ₃ COO NH ₄ 10mM trong 95% H ₂ O + 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
B	Nước: Acquity® UPLC® - DAD và SQD	Nước: HSS T3 (1,8µm, 2,1*100mm)	A: CH ₃ COO NH ₄ 10mM trong 95% H ₂ O + 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

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

Mô tả các thử nghiệm sinh học

Đánh giá hoạt tính của TLR7 và TLR8

Khả năng hợp chất hoạt hóa TLR7 và/hoặc TLR8 ở người được đánh giá trong thử nghiệm chỉ thị tế bào sử dụng tế bào HEK293 chuyển nạp tạm thời với vector biểu hiện TLR7 hoặc TLR8 và cấu tạo chỉ thị NF κ B-luc.

Một cách vắn tắt, tế bào HEK293 phát triển trong môi trường cấy (DMEM được bổ sung bằng FCS 10% và glutamin 2mM). Để tế bào chuyển nạp trong các đĩa 15cm, tế bào được tách rời bằng Trypsin-EDTA, chuyển nạp bằng hỗn hợp plasmid CMV-TLR7 hoặc TLR8 (1700ng), plasmid NF κ B-luc (850ng) và chất chuyển nạp và ủ trong 48 giờ ở 37°C trong môi trường CO₂ 5% được làm ẩm. Tế bào chuyển nạp sau đó được rửa trong PBS, được tách rời bằng Trypsin-EDTA và tái huyền phù trong môi trường đến tỉ trọng là $1,25 \times 10^5$ tế bào/ml. Bốn mươi microlit tế bào sau đó được pha chế vào từng giếng trong các đĩa 384 giếng, mà đã có 200nl hợp chất trong 100% DMSO. Tiếp theo ủ 6 giờ ở 37°C, CO₂ 5%, hoạt tính luciferaza được xác định bằng cách bổ sung 15 μ l cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi giếng và sự hiển thị thực hiện trên bộ tạo ảnh khay vi thể ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Đường cong đáp ứng liều được tạo thành từ các phép đo thực hiện bốn lần. Các giá trị nồng độ có hiệu quả thấp nhất (lowest effective concentrations - LEC), được định nghĩa là nồng độ mà đạt hiệu quả ít nhất gấp hai lần sai lệch chuẩn của thử nghiệm, được xác định cho mỗi hợp chất.

Tính độc của hợp chất được xác định ở phiên mỏng sử dụng lớp pha loãng giống nhau của hợp chất với 40 μ l tính theo giếng tế bào chuyển nạp với cấu trúc CMV-TLR7 riêng ($1,25 \times 10^5$ tế bào/ml), trong các đĩa 384 giếng. Khả năng sống của tế bào được đo sau 6 giờ ủ ở 37°C, CO₂ 5% bằng cách bổ sung ATP lite 15 μ l (Perkin Elmer) tính theo giếng và đọc trên bộ tạo ảnh khay vi thể ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Số liệu được ghi nhận là CC₅₀.

Ở phiên mỏng, lớp pha loãng giống nhau của hợp chất được sử dụng (200 nl hợp chất trong DMSO 100%) với 40 μ l mỗi giếng là tế bào chuyển nạp với cấu trúc chỉ thị NF κ B-luc riêng ($1,25 \times 10^5$ tế bào/ml). Sáu giờ sau khi ủ ở 37°C, CO₂ 5%, hoạt tính luciferaza được xác định bằng cách bổ sung 15 μ l cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào từng giếng và sự hiển thị được thực hiện trên bộ tạo ảnh khay vi thể

ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Số liệu đếm sàng lọc được ghi nhận dưới dạng LEC.

Sự hoạt hóa các thành phần gen khởi đầu ISRE

Tiềm năng hợp chất tạo thành IFN-I cũng được đánh giá bằng cách xác định sự hoạt hóa của các thành phần đáp lại kích thích interferon (interferon-stimulated responsive elements - ISRE) bằng môi trường điều kiện từ PBMC. Thành phần ISRE của trình tự GAAACTGAACT đáp lại cao với yếu tố phiên mã STAT1-STAT2-IRF9, hoạt động dựa trên liên kết của IFN-I với thụ thể IFNAR của chúng (Clontech, PT3372-5W). Plasmid pISRE-Luc từ Clontech (số 631913) có chứa 5 bản sao thành phần ISRE này, tiếp theo là luciferaza đơn độc ORF. Dòng tế bào HEK293 chuyển nạp ổn định cùng pISRE-Luc (HEK-ISREluc) đã có sẵn với profin môi trường cấy tế bào PBMC điều kiện.

Một cách vắn tắt, các PBMC được điều chế từ lớp giữa huyết tương và hồng cầu của ít nhất hai thể cho sử dụng giao thức ly tâm Ficoll chuẩn. Các PBMC phân lập được tái huyền phù trong môi trường RPMI được bổ sung với huyết thanh AB ở người 10% và 2×10^5 tế bào/giếng được pha chế vào các đĩa có 384 giếng chứa hợp chất (tổng thể tích 70 μ l). Sau khi ủ qua đêm, 10 μ l dịch nổi được chuyển vào các đĩa có 384 giếng chứa 5×10^3 HEK-ISREluc tế bào/giếng trong 30 μ l (được cấy trên đĩa từ ngày hôm trước). Sau 24 giờ ủ, sự hoạt hóa của các thành phần ISRE được đo bằng việc thử nghiệm hoạt tính luciferaza sử dụng 40 μ l/giếng cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) và được đo với bộ tạo ảnh khay vi thể ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Hoạt tính kích thích của mỗi hợp chất trên tế bào HEK-ISREluc được ghi nhận là giá trị LEC, được định nghĩa là nồng độ hợp chất được áp dụng với các PBMC được tạo ra trong hoạt tính luciferaza gấp ít nhất hai lần độ lệch chuẩn của thử nghiệm. LEC lần lượt chỉ độ hoạt hóa ISRE lên sự chuyển của lượng môi trường cấy PBMC đã xác định. Interferon tái tổ hợp α -2a (Roferon-A) được dùng làm hợp chất điều khiển chuẩn.

Bảng 2. Hoạt tính của hợp chất có công thức (I).

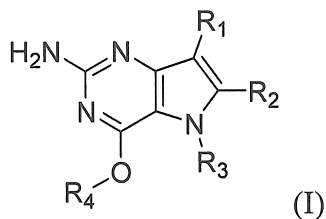
Tất cả hợp chất đã chứng minh $CC_{50} > 24 \mu$ M.

#	TLR 7 ở người (LEC) μM	TLR 8 ở người (LEC) μM	HEK-ISRE luc (LEC) μM
1	0,6	>25	0,4
2	2,7	>25	0,5
3	0,1	>25	0,03
4	1,4	>25	0,6
5	0,4	>25	0,1
6	3,9	>25	2
7	0,08	>25	0,03
8	0,03	>25	0,01
9	0,07	>25	NA
10	0,5	>25	NA
11	0,6	>25	NA

NA = không khả dụng (not available)

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức (I):



và muối được dụng của chúng, solvat hoặc dạng đa hình của chúng trong đó:

R₁ là H, flo hoặc metyl;

R₂ là H, halogen hoặc C₁₋₃ alkyl;

R₃ là C₁₋₆ alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ aryloxy, dị vòng, halogen, aryl, alkylamino, dialkylamino, C₁₋₆ alkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, amit của axit carboxylic, nitril, hoặc C₁₋₆ alkoxy;

hoặc trong đó:

R₃ là alkylaryl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, aryloxy, aryl, alkylamino, dialkylamino, C₁₋₆ alkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, amit của axit carboxylic, sulfonamit, nitril, hoặc C₁₋₆ alkoxy;

R₄ là C₁₋₆ alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₃₋₇ xycloalkyl, C₂₋₆ alkenyl hoặc aryl còn tùy ý được thế bằng C₁₋₆ alkyl, và C₃₋₇ xycloalkyl còn tùy ý được thế bằng C₁₋₆ alkyl;

hoặc trong đó:

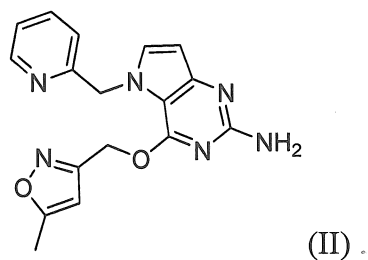
R₄ là alkylaryl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, aryloxy, aryl, alkylamino, dialkylamino, C₁₋₆ alkyl, axit carboxylic, este của axit carboxylic, amit của axit carboxylic, sulfonamit, nitril, hoặc C₁₋₆ alkoxy.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₃ là nhóm CH₂-aryl (được thế hoặc không được thế), và R₁, R₂, và R₄ được mô tả như ở điểm 1.

3. Hợp chất có công thức (I) trong đó R₃ và R₄ đều là nhóm CH₂-aryl còn tùy ý được thế như được mô tả ở điểm 1, và trong đó R₁, và R₂ như được mô tả ở điểm 1.

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R_1 là flo, R_2 là hydro, và R_3 và R_4 được mô tả như ở điểm 1.

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có cấu trúc hóa học dưới đây:



6. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc (II) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của chúng theo điểm 1 hoặc 5 cùng với một hoặc nhiều tá dược dược dụng, chất pha loãng hoặc chất mang.