



(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)   
**1-0022954**

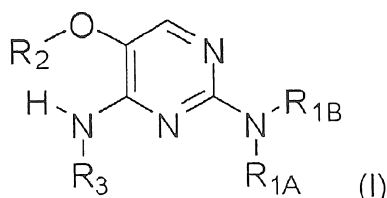
(51)<sup>7</sup> **C07D 213/75, A61K 31/505, A61P**  
**31/12, C07D 239/48**

(13) **B**

- 
- (21) 1-2015-01203 (22) 03.10.2013  
(86) PCT/EP2013/070619 03.10.2013 (87) WO2014/053595 10.04.2014  
(30) 12187519.9 05.10.2012 EP  
(45) 25.02.2020 383 (43) 25.08.2015 329  
(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),  
EMBRECHTS, Werner (BE), LAST, Stefaan Julien (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 AXYLAMINOPYRIMIDIN DÙNG TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH  
NHIỄM VIRUT VÀ CÁC BỆNH KHÁC VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT  
NÀY**

(57) **Sáng chế đề cập đến hợp chất axylaminopyrimidin và dược phẩm chứa hợp  
chất này để sử dụng trong điều trị bệnh.**



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến hợp chất axylaminopyrimidin, quy trình điều chế và được phẩm chứa hợp chất này để sử dụng trong điều trị bệnh.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

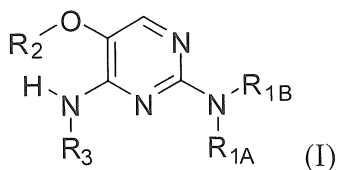
Sáng chế đề cập đến hợp chất axylaminopyrimidin để sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm virus, rối loạn miễn dịch và bệnh ung thư, hoặc làm chất phụ trợ vacxin, mà trong đó việc gây kích thích interferon được mong muốn. Trong điều trị một số bệnh nhiễm virus, việc tiêm interferon (IFN-typ 1) đều đặn có thể được sử dụng, như trường hợp đối với virus viêm gan C (HCV). Để biết thêm thông tin, xem tài liệu tham khảo Fried et. al. Peginterferon-alfa plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection, N Engl J Med 2002; 347: 975-82. Các chất gây kích thích IFN dạng phân tử nhỏ khả dụng qua đường miệng mang lại các lợi thế tiềm năng là tính sinh miễn dịch giảm và sự tiện lợi trong việc sử dụng. Do đó, các chất gây kích thích IFN mới là lớp được chất mới có hiệu quả tiềm năng trong điều trị các bệnh nhiễm virus. Để biết một ví dụ trong tài liệu kỹ thuật về chất gây kích thích IFN dạng phân tử nhỏ có tác dụng kháng virus, xem tài liệu De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P. Science 1978, 200, 563-565.

Các hợp chất có bản chất gần với sáng chế đã được bộc lộ trong WO2012/136834. Các chất điều biến IFN có cấu trúc pyrimidin đã được bộc lộ trong tài liệu Bello et. al., J. Med Chem. 2008, 51, 2734-2743, US5,434,157A và WO2006/053109.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu lớn về các chất gây kích thích interferon mới mà có profin độ an toàn cải thiện so với các hợp chất đã biết hiện nay.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

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



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

R<sub>1A</sub> được chọn từ nhóm bao gồm hydro, nhóm axyl hoặc axyloxy được thế hoặc không được thế,

R<sub>1B</sub> được chọn từ nhóm bao gồm hydro, nhóm axyl hoặc axyloxy được thế hoặc không được thế,

với điều kiện là R<sub>1A</sub> và R<sub>1B</sub> không đồng thời là hydro,

R<sub>2</sub> là C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>1-6</sub> alkoxy, arylalkyl hoặc heteroarylalkyl, mỗi nhóm trong số này được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, di-(C<sub>1-6</sub>)alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>1-6</sub> alkoxy, C<sub>3-6</sub> xycloalkyl, axit carboxylic, este carboxylic, amit carboxylic, dị vòng, dị vòng dạng hai vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril, và

R<sub>3</sub> là C<sub>1-8</sub> alkyl hoặc arylalkyl, mỗi nhóm trong số này được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C<sub>1-6</sub> alkyl, di-(C<sub>1-6</sub>)alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkoxy, C<sub>3-6</sub> xycloalkyl, axit carboxylic, este carboxylic thơm hoặc béo, amit carboxylic, dị vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) trong đó R<sub>1A</sub> và/hoặc R<sub>1B</sub> là axyl được thế hoặc không được thế, và trong đó R<sub>2</sub> là C<sub>1-6</sub> alkyl, tốt hơn là -CH<sub>3</sub>, và R<sub>3</sub> là C<sub>1-8</sub> alkyl được thế bằng alkyleste.

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) trong đó R<sub>1A</sub> và/hoặc R<sub>1B</sub> là isobutyryl, và trong đó R<sub>2</sub> là -CH<sub>3</sub> và R<sub>3</sub> là heptan-3-yl isobutyrat.

Hợp chất có công thức (I) ở dạng hóa học lập thể bất kỳ, và muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó, có hoạt tính làm dược chất, đặc biệt là làm chất gây kích thích interferon.

Vì vậy, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối, solvat hoặc dạng 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 hoặc dạng đa hình được dụng của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng 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 hoặc dạng đa hình được dụng của nó, hoặc được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình được dụng của nó có thể được sử dụng một cách phù hợp trong điều trị rối loạn có liên quan đến việc gây kích thích interferon.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1. Mức interferon đo được trong gan (A) và trong huyết tương (B) sau khi sử dụng liều đơn của hợp chất 1 qua đường miệng với lượng là 15,5mg/kg ở chuột nhắt.

Fig.2. Sự biểu hiện CXCL10 đo được trong gan (C)\* và trong máu (D) sau khi sử dụng liều đơn của hợp chất 1 qua đường miệng với lượng là 15,5mg/kg ở chuột nhắt.

\*một mẫu tại thời điểm 4 giờ được loại bỏ do trị số HPRT1 cao

#### **Mô tả chi tiết sáng chế**

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

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

Thuật ngữ “axy” chỉ nhóm được thể hiện là  $-(C=O)R$ , trong đó R là alkyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl được thể hoặc không được thể.

Thuật ngữ “axyloxy” chỉ nhóm được thể hiện là  $-(C=O)OR$ , trong đó R là alkyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl được thể hoặc không được thể.

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

Thuật ngữ “alkynyl” chỉ alkyl như được định nghĩa ở trên, chứa ít nhất hai nguyên tử cacbon và ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon.

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

Thuật ngữ “alkoxy” chỉ nhóm alkyl (chuỗi cacbon và hydro) được liên kết đơn với oxy (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, đặc biệt là từ N và O. Cấu trúc vòng thơm này có thể có 5, 6 hoặc 7 nguyên tử vòng. Đặc biệt là, cấu trúc vòng thơm này có thể có 5 hoặc 6 nguyên tử vòng.

Thuật ngữ “dị vòng dạng hai vòng” có nghĩa là cấu trúc vòng thơm, như được định nghĩa cho thuật ngữ “aryl”, chứa hai vòng thơm ngưng tụ. Mỗi vòng tùy ý chứa các nguyên tử khác loại được chọn từ N, O và S, đặc biệt là từ N và O.

Thuật ngữ “arylalkyl” có nghĩa là cấu trúc vòng thơm, như được định nghĩa cho thuật ngữ “aryl”, được thế tùy ý bằng nhóm alkyl.

Thuật ngữ “heteroarylalkyl” có nghĩa là cấu trúc vòng thơm, như được định nghĩa cho thuật ngữ “heteroaryl”, được thế tùy ý bằng nhóm alkyl.

“Dị vòng” chỉ phân tử no hoặc no một phần và bao gồm etyloxit, tetrahydrofuran, dioxan hoặc các ete dạng vòng khác. Dị vòng chứa nitơ bao gồm, ví dụ, azetidín, morpholin, piperidin, piperazin, pyrrolidin, và dạng tương tự. Các dị vòng khác bao gồm, ví dụ, thiomorpholin, dioxolín, và các sulfon dạng vòng.

Nhóm “heteroaryl” là nhóm dị vòng có bản chất là thơm. Nhóm này có dạng một vòng, hai vòng hoặc đa vòng chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ N, O hoặc S. Nhóm heteroaryl có thể là, ví dụ, imidazolyl, isoxazolyl, furyl, oxazolyl, pyrölyl, pyridonyl, pyridyl, pyridazinyl, pyrazinyl, v.v..

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 axit mà tạo ra muối không độc. Muối bazơ thích hợp được tạo ra từ bazơ mà tạo ra muối không độc.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại ở dạng solvat hóa hoặc dạng không 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 “dạng 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, kết tinh, khô lạnh, sấy phun hoặc làm khô theo kiểu bay hơi. Chúng có thể được sử dụng ở dạng riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất 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 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 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 được dụng, chất mang này có thể có rất nhiều dạng khác nhau tùy thuộc vào dạng chế phẩm muốn sử dụng. Tốt hơn là các dược phẩm này ở dạng liều đơn vị thích hợp, ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, trực tràng hoặc qua da. Ví dụ, để bào chế chế phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, môi trường bất kỳ trong số các môi trường được dụng thông thường có thể được sử dụng như, 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 chế phẩm dạng bột, viên tròn, viên nang và viên nén. Do dễ sử dụng, viên nén và viên nang là các dạng đơn vị liều dùng qua đường miệng thuận lợi nhất, trong trường hợp này, các chất mang rắn được dụng hiện 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 chế phẩm dạng

lông. 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 phân hoặc có lớp bao), viên nang, viên tròn, bột đóng gói, viên nhện (wafer), thuốc đạn, dung dịch hoặc hỗn dịch có thể tiêm được và dạng tương tự, và các liều chia nhỏ của nó.

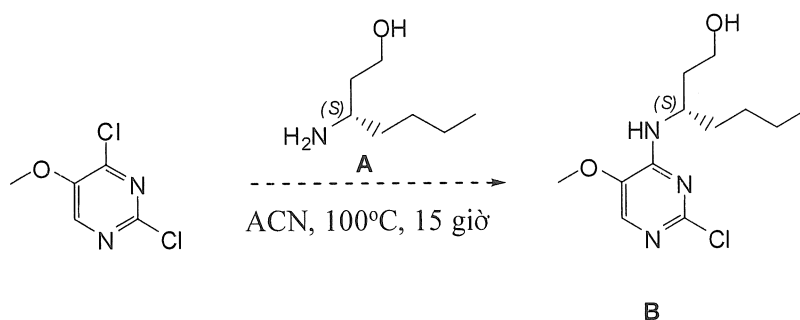
Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực điều trị bệnh lây nhiễm sẽ có khả năng xác định lượng có tác dụng từ các kết quả thử nghiệm được trình bày dưới đây. Nhìn chung, dự định là lượng hằng ngày có tác dụng sẽ nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 50mg/kg thể trọng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 10mg/kg thể trọng. Có thể là thích hợp nếu sử dụng liều cần thiết ở dạng hai, ba, bốn hoặc nhiều liều chia nhỏ vào các khoảng cách thời gian thích hợp trong ngày. Các liều chia nhỏ 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 bệnh nhân có thể đang dùng, như đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, hiện

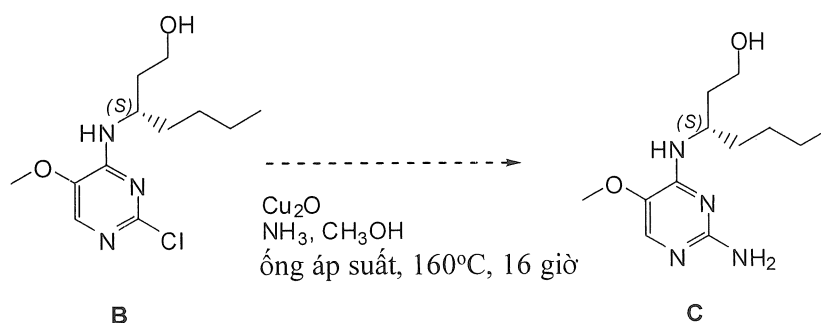
nhiên là lượng có tác dụng có thể được làm giảm đi hoặc tăng lên tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào sự đánh giá của bác sĩ điều trị kê đơn hợp chất theo sáng chế. Do đó, khoảng trị số về lượng có tác dụng nêu trên chỉ là hướng dẫn và không nhằm làm giới hạn phạm vi hoặc ứng dụng của sáng chế ở bất kỳ mức độ nào.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### Điều chế hợp chất 1



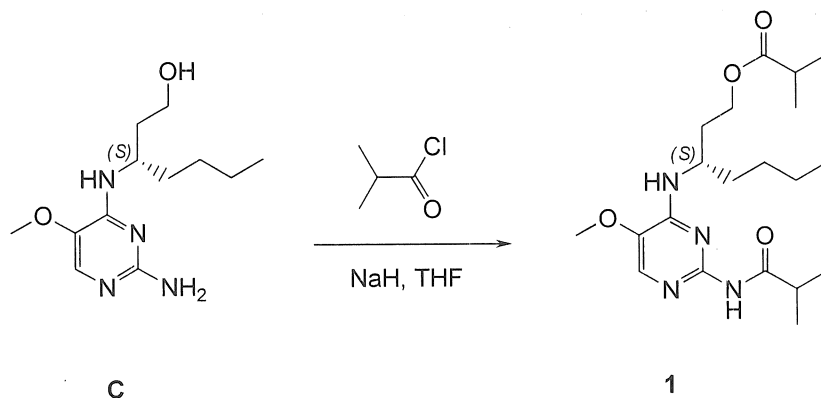
2,4-diclo-5-metoxypyrimidin (2,0g, 11,7mmol) và axetonitril (20mL), diisopropyletylamin (3,02g, 23,4mmol) và (S)-3-aminoheptanol (4,59g, 35,1mmol) được cho vào lọ loại 50mL có trang bị thanh khuấy từ. Hỗn hợp phản ứng được để trong điều kiện khuấy 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng gradien diclometan đến metanol 10% trong diclometan. Các phân đoạn tốt nhất được gộp lại và các dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được chất rắn màu trắng, B.



B (1g, 3,66mmol),  $\text{NH}_3$  (10mL, trong nước), amoni bicacbonat (3,34g, 42,3mmol) và đồng (I) oxit (121mg, 0,85mmol) được cho vào lọ thủy tinh có thành dày có trang bị thanh khuấy từ. Lọ này được đóng kín và được đặt vào trong bể dầu và được làm nóng đến 150°C trong 15 giờ. Hỗn hợp phản ứng được chiết bằng diclo-



metan (3 x 25mL), các lớp hữu cơ được gộp lại và được làm khô qua magie sulfat. Các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và các dung môi của dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô C được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC.

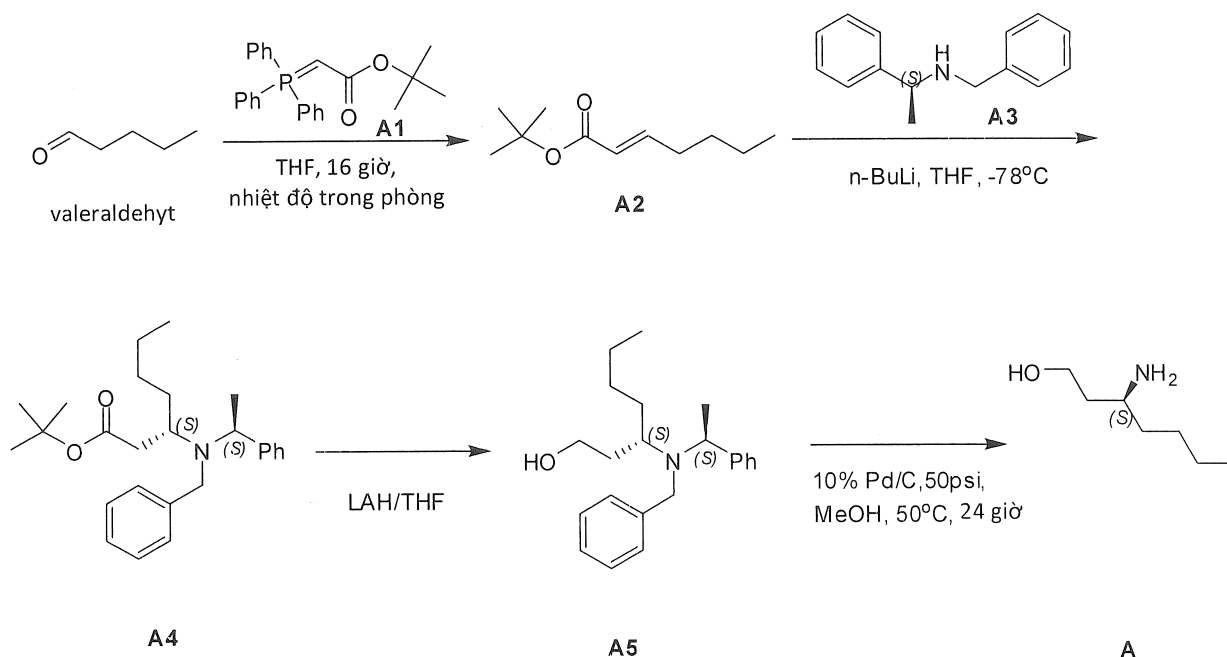


C (463mg, 1,82mmol) được hòa tan trong THF (13mL) và được làm lạnh đến -78°C. NaH (145mg, 3,64mmol, thể phân tán 60% trong dầu khoáng) được thêm vào theo một phần và được khuấy ở -78°C trong 30 phút. Isobutyryl clorua (389μL, 3,64mmol) được thêm vào theo từng giọt ở -78°C và được khuấy trong 10 phút. Bể làm lạnh được bỏ đi và hỗn hợp được để cho đạt đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp này được làm dừng bằng nước và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC (RP Vydac Denali C18 10μm, 200g, 5cm, pha động: dung dịch NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,25% trong nước, axetonitril), các phân đoạn mong muốn được thu lại, và các dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm tinh khiết.

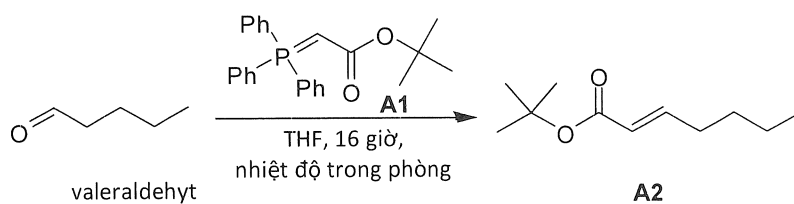
LC-MS: m/z = 395 (M+H), thời gian lưu: 1,1 phút, phương pháp LC: A.

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 0,83 (t, *J*=6,90 Hz, 3 H) 0,98 - 1,07 (m, 12 H) 1,16 - 1,35 (m, 4 H) 1,44 - 1,62 (m, 2 H) 1,84 (q, *J*=6,78 Hz, 2 H) 2,45 (spt, *J*=7,00 Hz, 1 H) 2,96 (br. s., 1 H) 3,80 (s, 3 H) 3,92 - 4,07 (m, 2 H) 4,18 - 4,31 (m, 1 H) 6,69 (d, *J*=9,03 Hz, 1 H) 7,60 (s, 1 H) 9,49 (s, 1 H).

Sơ đồ tổng hợp để điều chế A



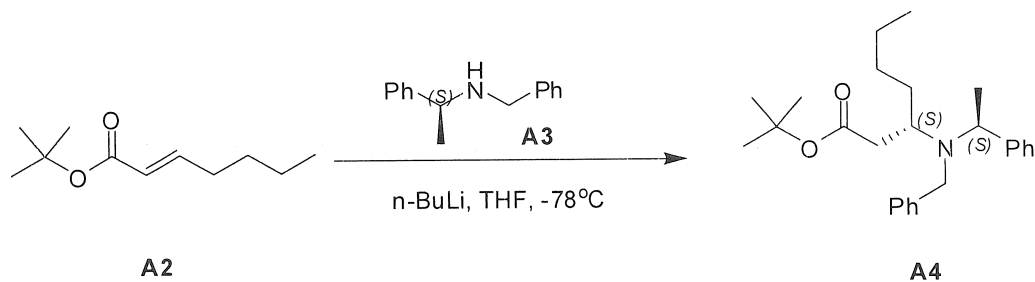
#### Điều chế A2



A1 (200g, 532mmol) được thêm vào dung dịch chứa valeraldehyt (43g, 500mmol) trong THF (1L) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các dung môi được làm bay hơi và phần cặn được pha loãng trong ete dầu mỏ và được lọc. Các dung môi của dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký silic oxit bằng cách sử dụng gradien ete dầu mỏ đến etyl axetat 3% trong ete dầu mỏ để thu được A2 (90g) dưới dạng chất dầu không màu.

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm 6,81-6,77 (m, 1H), 5,68-5,64 (td,  $J=1,2\text{Hz}$ , 15,6 Hz, 1H), 2,11-2,09 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,38-1,26 (m, 4H), 0,85-0,81 (t,  $J=7,2\text{Hz}$ , 3H).

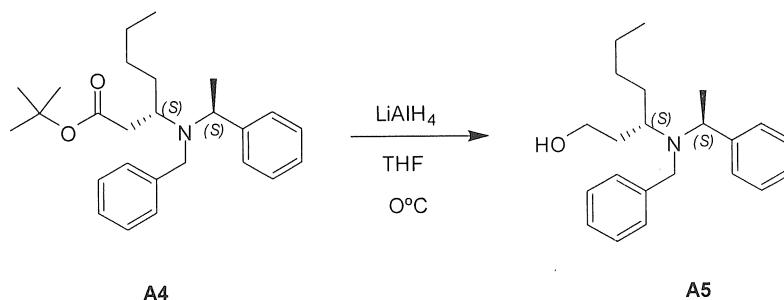
#### Điều chế hợp chất A4



*n*-butyl lithi (290mL, 725mmol) được thêm vào dung dịch đã khuấy chứa A3 (165g, 781mmol) trong THF (800mL) ở  $-78^\circ\text{C}$ . Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút, sau đó A2 (90g, 488,4mmol) trong THF (400mL) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở  $-78^\circ\text{C}$ . Hỗn hợp này được làm dừng bằng dung dịch nước  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bão hòa và được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm được chia tách giữa etyl axetat và nước. Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô và được làm bay hơi. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột, rửa giải bằng etyl axetat 5% trong ete dầu mỏ để thu được chất dầu không màu, A4 (132g).

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm 7,36-7,16 (m, 10H), 3,75-3,70 (m, 2H), 3,43-3,39 (d,  $J=15,2\text{Hz}$ , 1H), 3,33-3,15 (m, 1H), 1,86-1,80 (m, 2H), 1,47-1,37 (m, 2H), 1,32 (s, 9H), 1,26-1,17 (m, 7H), 0,83-0,79 (t,  $J=7,2\text{Hz}$ , 3H).

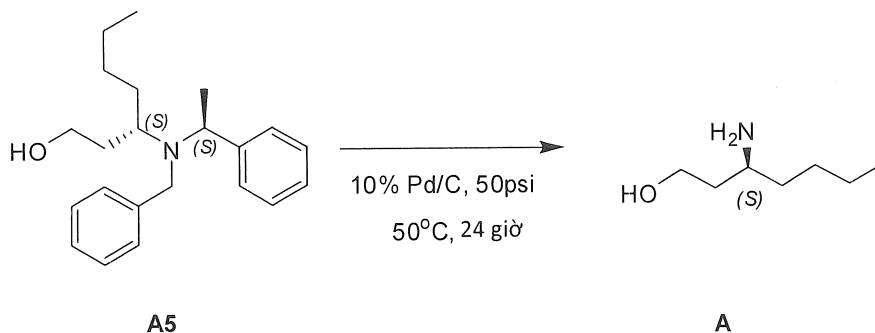
Điều chế A5



A4 (130g, 328mmol) được hòa tan trong THF (1,5L) và LAH (20g, 526mmol) được thêm vào ở  $0^\circ\text{C}$  theo các phần nhỏ. Hỗn hợp thu được được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 2 giờ và sau đó được để cho ấm đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được làm dừng bằng dung dịch nước  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bão hòa. Sản phẩm được chia tách giữa etyl axetat và nước. Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối, được làm khô và được làm bay hơi. Các lớp hữu cơ gộp lại được làm khô qua natri sulfat, các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được cô để thu được sản phẩm thô A5 (100g), sản phẩm này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm 7,33-7,14 (m, 10H), 3,91-3,86 (m, 1H), 3,80-3,77 (d,  $J=13,6\text{Hz}$ , 1H), 3,63-3,60 (d,  $J=13,6\text{Hz}$ , 1H), 3,43-3,42 (m, 1 H), 3,15-3,10 (m, 1H), 2,70-2,63 (m, 2H), 1,65-1,28 (m, 10H), 0,89-0,81 (m, 3H).

Điều chế A



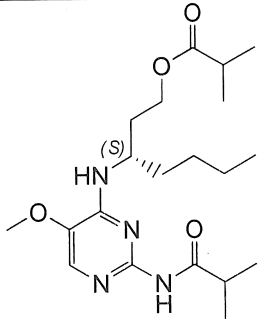
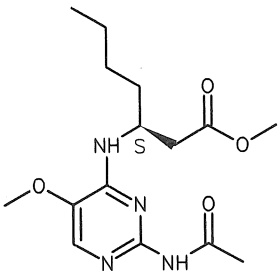
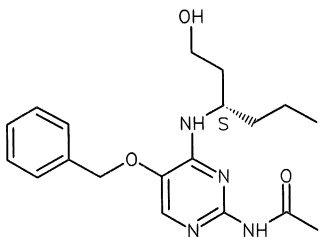
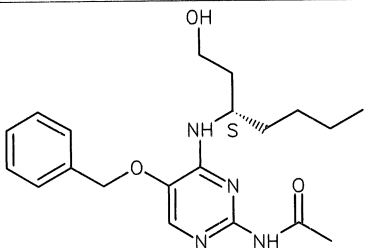
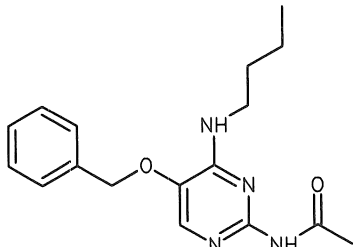
Dung dịch chứa A5 (38g, 116,75mmol) và Pd/C 10% trong metanol (200mL) được hydro hóa dưới môi trường hydro 50psi (0,34MPa) ở 50°C trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc và dung môi được làm bay hơi để thu được A.

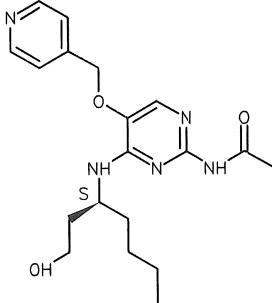
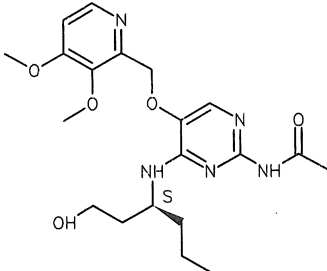
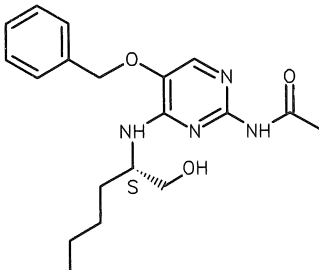
$^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  ppm 8,04 (s, 3H), 3,60-3,49 (m, 2H), 3,16-3,15 (m, 1H), 1,71-1,67 (m, 2H), 1,60-1,55 (m, 2H), 1,33-1,26 (m, 4H), 0,90-0,87 (t,  $J=6,8\text{Hz}$ , 3H).

Phương pháp phân tích

Các hợp chất 1-8 trong bảng nêu dưới đây được xác định đặc điểm bằng kỹ thuật LC-MS theo phương pháp LC-MS nêu dưới đây.

UPLC (sắc ký lỏng siêu hiệu năng) pha đảo được tiến hành trên cột C18 thể lai etylsiloxan/silic oxit có cầu nối (BEH) (1,7 $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50mm; Waters Acquity) với lưu lượng là 0,8mL/phút. Hai pha động (amoniac axetat 10mM trong  $\text{H}_2\text{O}$ /axetonitril 95/5; pha động B: axetonitril) được sử dụng để chạy điều kiện gradien từ 95% A và 5% B đến 5% A và 95% B trong 1,3 phút và giữ trong 0,7 phút. Thể tích tiêm là 0,75 $\mu\text{L}$  được sử dụng. Điện thế của nón là 30V đối với chế độ ion hóa dương và 30V đối với chế độ ion hóa âm.

|   | Cấu trúc                                                                            | Khối lượng chính xác | Khối lượng phát hiện được [M+H] | Thời gian lưu LC-MS (phút) |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| 1 |    | 394,5                | 395                             | 1,1                        |
| 2 |    | 324,2                | 325                             | 0,83                       |
| 3 |   | 358,2                | 359                             | 0,88                       |
| 4 |  | 372,2                | 373                             | 0,94                       |
| 5 |  | 314,2                | 315                             | 1,2                        |

|   | Cấu trúc                                                                            | Khối lượng chính xác | Khối lượng phát hiện được [M+H] | Thời gian lưu LC-MS (phút) |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| 6 |    | 373,2                | 374                             | 0,7                        |
| 7 |    | 419,2                | 420                             | 0,73                       |
| 8 |  | 358,2                | 359                             | 0,89                       |

#### Sản xuất IFN- $\alpha$ và điều tiết tăng mARN của CXCL10 *in vivo*

Khả năng gây kích thích sự sản xuất IFN- $\alpha$  và điều tiết tăng mARN của CXCL10 *in vivo* của các hợp chất được đánh giá sau khi sử dụng qua đường miệng cho chuột nhắt C57BL/6. Lượng IFN- $\alpha$  trong hệ tuần hoàn toàn thân được theo dõi theo thời gian, bằng cách sử dụng ELISA chứa pan-IFN- $\alpha$  của chuột (PBL InterferonSource, ref. 42120). ELISA này nhận biết tất cả các typ phụ IFN- $\alpha$  của chuột. CXCL10 là gen được kích thích bằng interferon (ISG - interferon-stimulated gene) mà sự biểu hiện của nó được gây kích thích ở mức độ cao khi IFN-I liên kết với thụ thể IFNAR (thụ thể interferon alpha). Mức biểu hiện mARN của CXCL10 được theo dõi bằng RT-qPCR.

Đối với mỗi hợp chất và liều được thử nghiệm, 3 con chuột nhắt C57BL/6J cái, có độ tuổi nằm trong khoảng từ 6 đến 10 tuần, thể trọng nằm trong khoảng từ 20 đến

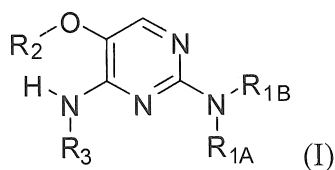
22g được thử nghiệm. Các con chuột này được cho nhận hợp chất 1 dưới dạng liều đơn dùng qua đường miệng là 15,5mg/kg ở dạng dung dịch 1,55mg/mL trong môi trường dẫn thuốc hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin 20% trong nước bằng cách sử dụng ống cho ăn. 0,5, 1, 2, 4 và 7 giờ sau khi dùng liều, máu toàn thân được hút ra từ tĩnh mạch đuôi vào trong các ống chứa K-EDTA. Huyết tương được tách ra khỏi các tế bào máu bằng cách ly tâm với tốc độ 1500g, 10 phút, 4°C và được bảo quản ở -80°C trước khi phân tích bằng ELISA. Tại mỗi thời điểm, độ lệch chuẩn và độ lệch trung vị đối với 3 con chuột nhất này được tính toán để đánh giá công hiệu của hợp chất.

Máu cũng được hút ra từ tĩnh mạch đuôi vào trong các ống Micronic chứa 500 $\mu$ L dung dịch PAXgene (ống PAXgene Blood RNA từ PreAnalytix). Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ trong phòng, các ống này được bảo quản ở -20°C trước khi chiết toàn bộ ARN bằng bộ kit PAXgene 96 Blood RNA (PreAnalytix). ARN đã được tinh chế được phiên mã ngược bằng cách sử dụng các đoạn mồi 6-mer ngẫu nhiên (bộ kit High-Capacity cDNA Archive, Applied Biosystems). Mức mARN của CXCL10 được xác định bằng kỹ thuật Taqman qPCR (hỗn hợp nước cái Taqman universal PCR, không UNG AmpErase và thử nghiệm Taqman Gene Expression Mm00445235\_m1 từ Applied Biosystems) trên hệ thống 7900HT Fast Real-time PCR (Applied Biosystems). Mức mARN của HPRT1 (hypoxanthin phosphoribosyltransferaza 1) được sử dụng làm đối chứng nội sinh (Mm01545399\_m1). Phương pháp  $\Delta\Delta C_t$  (để định lượng tương đối) được sử dụng để đánh giá việc điều tiết sự biểu hiện CXCL10 bởi hợp chất so với đối chứng là môi trường dẫn thuốc. Tại mỗi thời điểm, độ lệch chuẩn và độ lệch trung vị đối với 3 con chuột nhất này được tính toán để đánh giá công hiệu của các hợp chất.

Việc gây kích thích interferon nội sinh và điều tiết tăng CXCL10 được quan sát thấy trong gan và máu/huyết tương ở chuột nhất sau khi sử dụng liều đơn của hợp chất 1 qua đường miệng.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



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

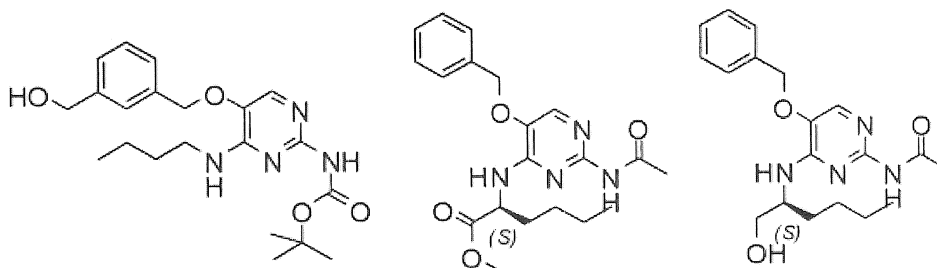
R<sub>1A</sub> là hydro,

R<sub>1B</sub> là nhóm axyl hoặc axyloxy,

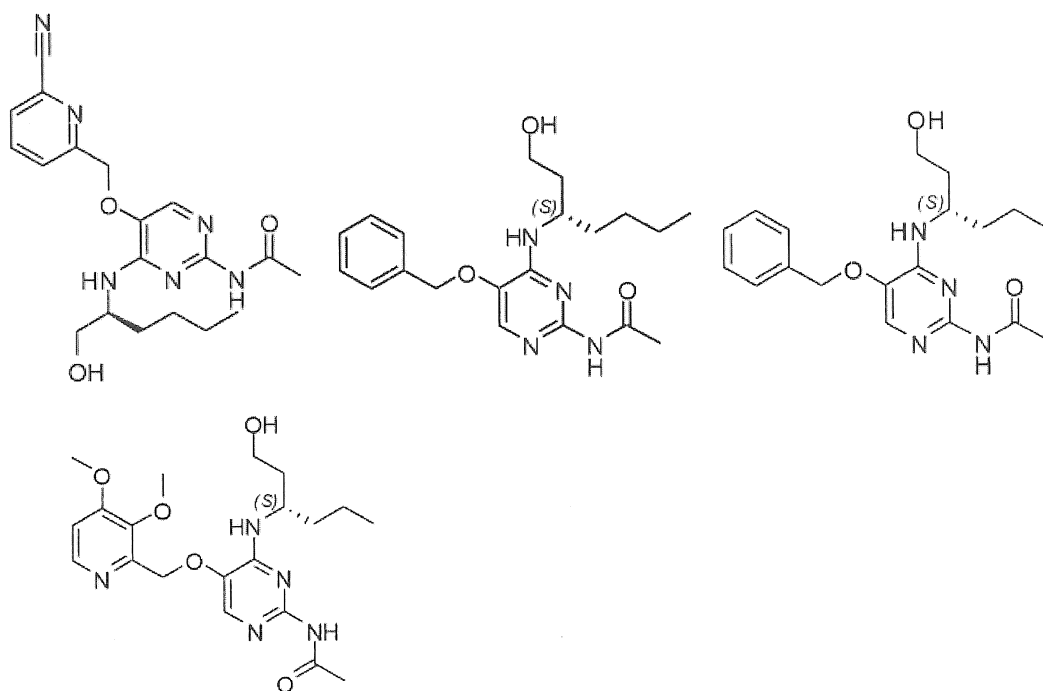
R<sub>2</sub> là C<sub>1-6</sub> alkyl, arylalkyl hoặc heteroarylalkyl, mỗi nhóm trong số này được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thể độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, di-(C<sub>1-6</sub>)alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>1-6</sub> alkoxy, C<sub>3-6</sub> xycloalkyl, axit carboxylic, este carboxylic, amit carboxylic, dị vòng, dị vòng dạng hai vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril, và

R<sub>3</sub> là C<sub>1-8</sub> alkyl hoặc arylalkyl, mỗi nhóm trong số này được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thể độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C<sub>1-6</sub> alkyl, di-(C<sub>1-6</sub>)alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkoxy, C<sub>3-6</sub> xycloalkyl, axit carboxylic, este carboxylic thơm hoặc béo, amit carboxylic, dị vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril,

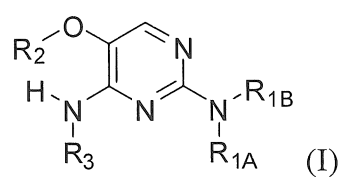
với điều kiện là hợp chất này không phải là hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu dưới đây:







2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó  $R_{1B}$  là axyl, và trong đó  $R_2$  là  $C_{1-6}$  alkyl, tốt hơn là - $CH_3$ , và  $R_3$  là  $C_{1-8}$  alkyl được thế bằng alkyleste.
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó  $R_{1B}$  là isobutyryl, và trong đó  $R_2$  là  $-CH_3$  và  $R_3$  là heptan-3-yl isobutyrat.
4. Hợp chất có công thức (I):



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

$R_{1A}$  là hydro,

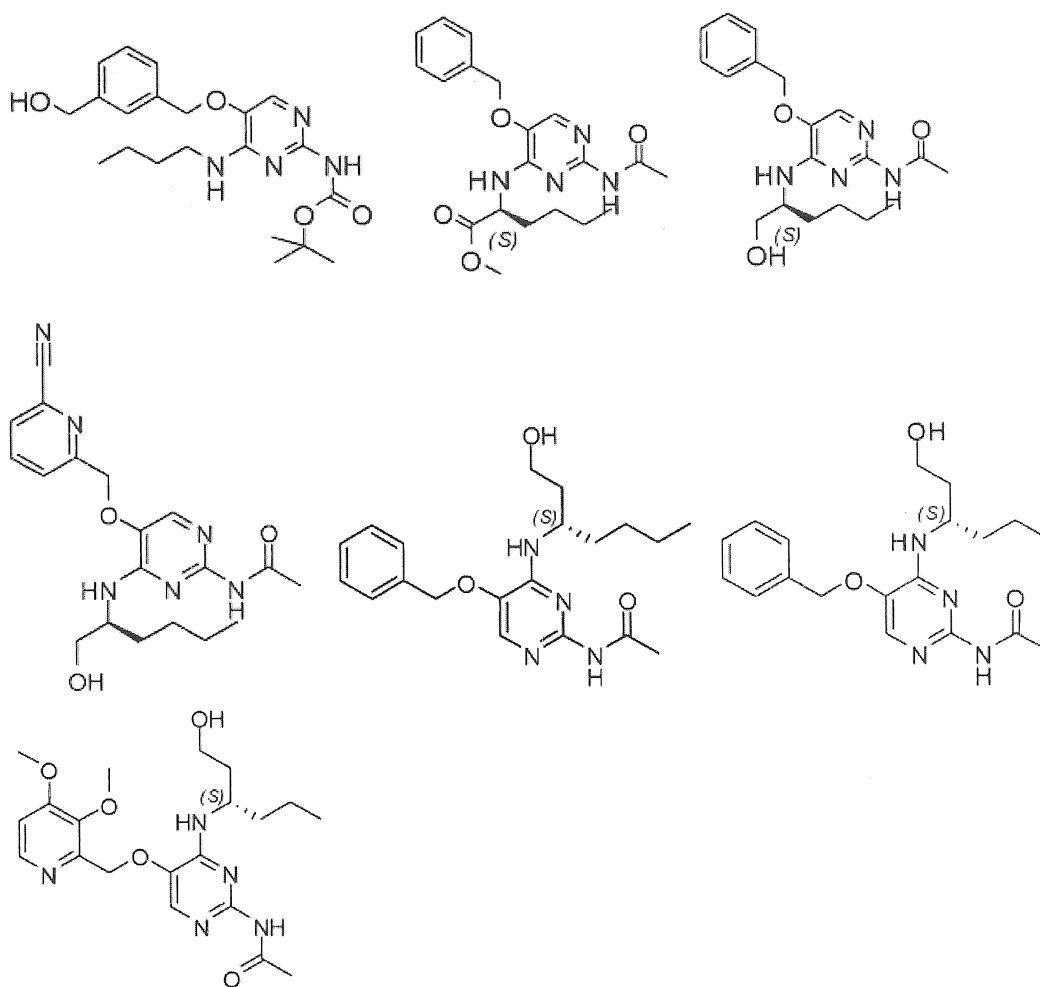
$R_{1B}$  là nhóm axyl hoặc axyloxy,

$R_2$  là  $C_{1-6}$  alkyl, arylalkyl hoặc heteroarylalkyl, mỗi nhóm trong số này được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, di- $(C_{1-6})$ alkylamino,  $C_{1-6}$  alkylamino,  $C_{1-6}$  alkyl,  $C_{1-6}$  alkoxy,  $C_{3-6}$  xycloalkyl, axit carboxylic, este carboxylic, amit carboxylic, dị vòng, dị vòng dạng hai vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril, và

R<sub>3</sub> là C<sub>1-8</sub> alkyl hoặc arylalkyl, mỗi nhóm trong số này được thể tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thể độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, amino, C<sub>1-6</sub> alkyl, di-(C<sub>1-6</sub>)alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkylamino, C<sub>1-6</sub> alkoxy, C<sub>3-6</sub> xycloalkyl, axit carboxylic, este carboxylic thơm hoặc béo, amit carboxylic, dị vòng, aryl, alkenyl, alkynyl, arylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl hoặc nitril,

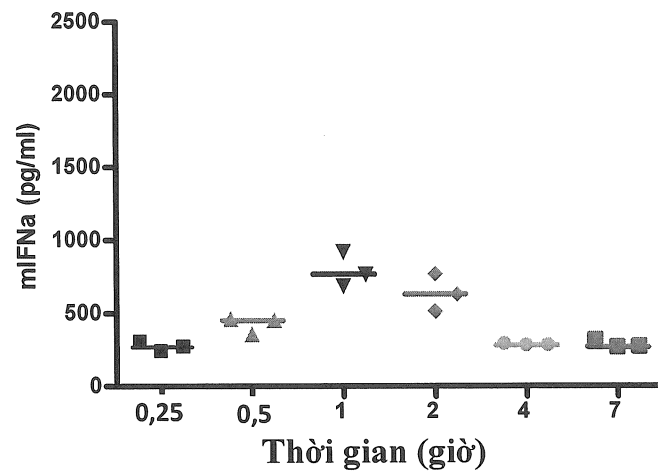
để dùng làm thuốc,

với điều kiện là hợp chất này không phải là hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu dưới đây:



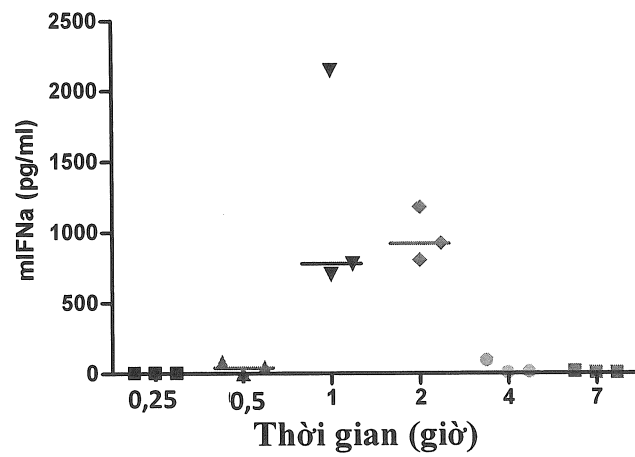
5. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc muối, solvat hoặc dạng đa hình dược dụng của nó cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

### Mức IFNa chuột nhắt trong gan

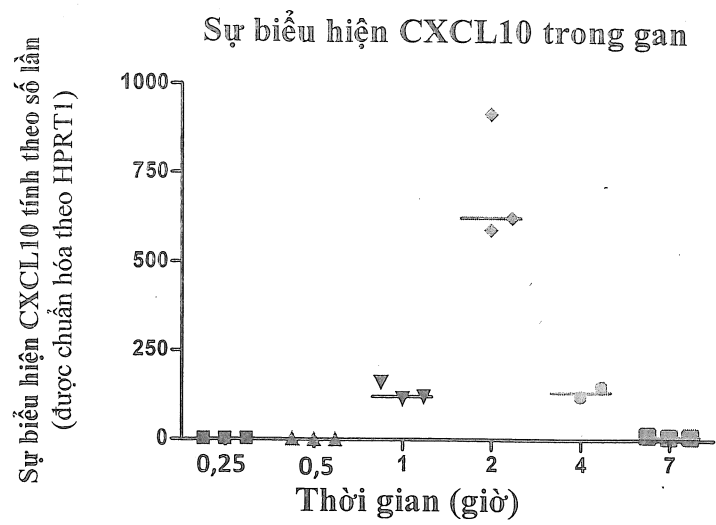


A

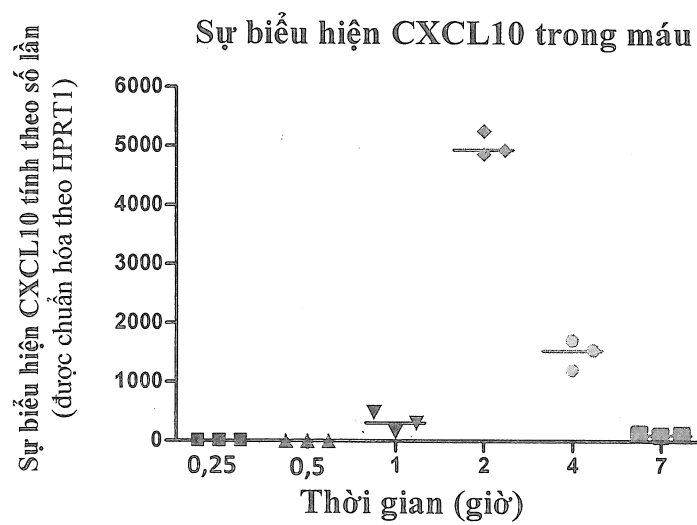
### Mức IFNa chuột nhắt trong huyết tương



B



C



D

Fig.2