



(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)



1-0027385

(51)⁷ A61K 31/706; C07D 487/04; A61K
31/16

(13) B

(21) 1-2016-02117

(22) 06/11/2014

(86) PCT/US2014/064412 06/11/2014

(87) WO2015/069939 14/05/2015

(30) 61/902,544 11/11/2013 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/10/2016 343A

(73) GILEAD SCIENCES, INC. (US)

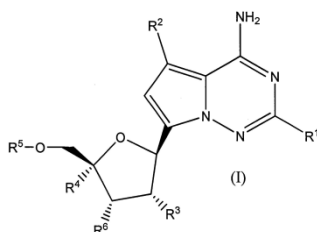
333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404, United States of America

(72) Michael O'Neil Hanrahan CLARKE (US); Edward DOERFFLER (US); Richard L. MACKMAN (US); Dustin SIEGEL (US).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) HỢP CHẤT PYROLO[1,2-F][1,2,4]TRIAZIN HỮU ÍCH ĐỂ ĐIỀU TRỊ NHIỄM VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất tetrahydrofuranyl-pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amin được thể có công thức (I) để điều trị bệnh nhiễm virut Pneumovirinae, kể cả nhiễm virut hợp bào hô hấp, cũng như các phương pháp và các chất trung gian để tổng hợp các hợp chất tetrahydrofuranyl-pyrolo [1,2-f] [1,2,4]triazin-4-amin.



Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa hợp chất nêu trên để điều trị bệnh nhiễm virut Pneumovirinae hoặc virut hợp bào hô hấp ở người.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất tetrahydrofuranyl-pyrol[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amin được thế, cũng như các phương pháp và các chất trung gian hữu ích để điều chế các hợp chất này, được phẩm để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae, đặc biệt bao gồm cả bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus Pneumovirinae là virus ARN sợi đơn đối mã mà chịu trách nhiệm về nhiều bệnh lý phổ biến ở người và động vật. Phân họ virus Pneumovirinae là một phần của họ Paramyxoviridae và bao gồm virus hợp bào hô hấp của người (human respiratory syncytial virus - HRSV). Hầu hết tất cả trẻ nhỏ sẽ đều bị nhiễm HRSV trước khi tròn hai tuổi. HRSV là nguyên nhân chính về nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, trong đó 0,5% đến 2% trong số trẻ bị nhiễm cần phải nhập viện. Người già và người lớn mắc bệnh tim, phổi mạn tính hoặc những người mà bị ức chế miễn dịch cũng chịu nguy cơ cao trong việc phát triển bệnh nghiêm trọng do HRSV (<http://www.cdc.gov/rsv/index.html>). Hiện chưa có vaccine để phòng ngừa nhiễm HRSV. Hiện có sẵn kháng thể đơn dòng palivizumab để phòng bệnh về mặt miễn dịch, nhưng việc sử dụng nó chỉ giới hạn ở trẻ nhỏ chịu nguy cơ cao, ví dụ, trẻ sinh non hoặc trẻ mắc bệnh tim hoặc bệnh phổi bẩm sinh, và chi phí để sử dụng nói chung thường là quá cao. Ngoài ra, chất tương tự nucleosit ribavirin đã được chấp nhận dùng làm tác nhân kháng virus duy nhất để điều trị bệnh nhiễm HRSV nhưng chỉ có tác dụng hạn chế. Do đó, cần có tác nhân điều trị kháng Pneumovirinae.

Các ví dụ về các hợp chất pyrolo[2,3-d]pyrimidin hữu ích để điều trị bệnh nhiễm virus được bộc lộ trong các công bố đơn yêu cầu cấp sáng chế Mỹ số U.S. 2012/0009147 A1 (Cho et al.), U.S. 2012/0020921 A1 (Cho et al.), các công bố đơn quốc tế số WO 2008/089105 A2 (Babu et al.), WO 2008/141079 A1 (Babu et al.), WO 2009/132135 A1 (Butler et al.), WO 2010/002877 A2 (Francom), WO 2011/035231 A1 (Cho et al.), WO

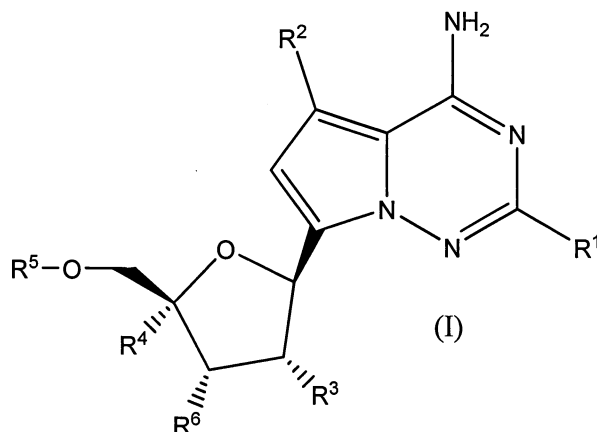
2011/035250 A1 (Butler et al.), WO 2011/150288 A1 (Cho et al.), WO 2012/012465 (Cho et al.), WO 2012/012776 A1 (Mackman et al.), WO 2012/037038 (Clarke et al.), WO 2012/087596 A1 (Delaney et al.), và WO 2012/142075 A1 (Girjavallabhan et al.).

Vẫn cần có các tác nhân kháng virus mới dùng được để điều trị nhiễm virus Paramyxoviridae, kể cả nhiễm virus Pneumovirinae, như nhiễm HRSV, mà là hữu hiệu và có biên dạng độc tính chấp nhận được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất, cũng như các phương pháp và các chất trung gian hữu ích để điều chế các hợp chất này, và được phẩm dùng để điều trị các bệnh do nhiễm họ virus Pneumovirinae gây ra, kể cả việc điều trị các bệnh do nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người gây ra.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó:



trong đó:

R¹ là H hoặc F;

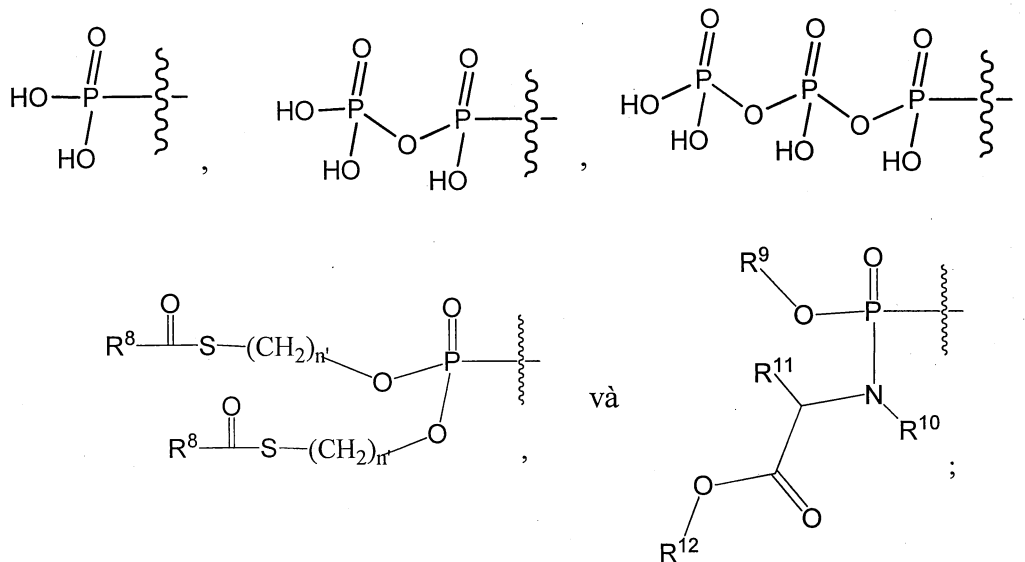
R² là H hoặc F;

R³ là OH hoặc F;

R⁴ là CN, C₁-C₄ alkyl, C₂-C₄ alkenyl, C₂-C₄ alkynyl, C₃-C₄ xycloalkyl, azido, halogen, hoặc C₁-C₂ haloalkyl;

R⁶ là OH;

R^5 được chọn từ nhóm gồm H và:

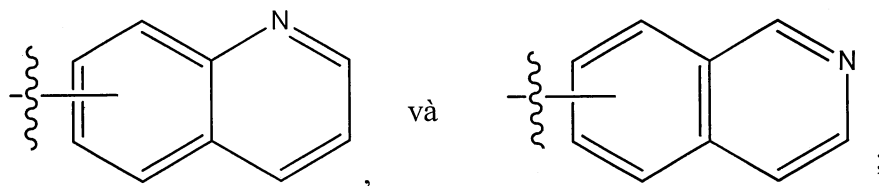


trong đó:

n' được chọn từ 1, 2, 3, và 4;

R^8 được chọn từ C_1 - C_8 alkyl, $-O$ - C_1 - C_8 alkyl, benzyl, $-O$ -benzyl, $-CH_2$ - C_3 - C_6 xycloalkyl, $-O$ - CH_2 - C_3 - C_6 xycloalkyl, và CF_3 ;

R^9 được chọn từ phenyl, 1-naphtyl, 2-naphtyl,



R^{10} được chọn từ H và CH_3 ;

R^{11} được chọn từ H hoặc C_1 - C_6 alkyl;

R^{12} được chọn từ H, C_1 - C_8 alkyl, benzyl, C_3 - C_6 xycloalkyl, và $-CH_2$ - C_3 - C_6 xycloalkyl.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^1 là H, và tất cả các biến khác, bao gồm $R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$, và n' là như đã xác định ở trên cho công thức (I).

Theo phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^2 là H, và tất cả các biến khác, bao gồm $R^1, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$, và n' là như đã xác định ở trên cho công thức (I).

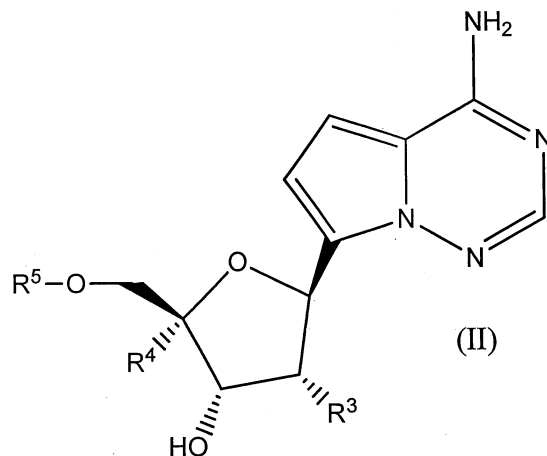
Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó cả R^1 và R^2 đều là H, và tất cả các biến khác, bao gồm $R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$, và n' là như đã xác định ở trên cho công thức (I).

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó cả R^1, R^2 , và R^5 đều là H, và tất cả các biến khác, bao gồm $R^3, R^4, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$, và n' là như đã xác định ở trên cho công thức (I).

Theo một phương án riêng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó cả R^1 và R^2 đều là H, R^3 là OH, và tất cả các biến khác, bao gồm $R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$, và n' là như đã xác định ở trên cho công thức (I).

Theo một phương án riêng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó, trong đó cả R^1 và R^2 đều là H, R^3 là F, và tất cả các biến khác, bao gồm $R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$, và n' là như đã xác định ở trên cho công thức (I).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của nó:

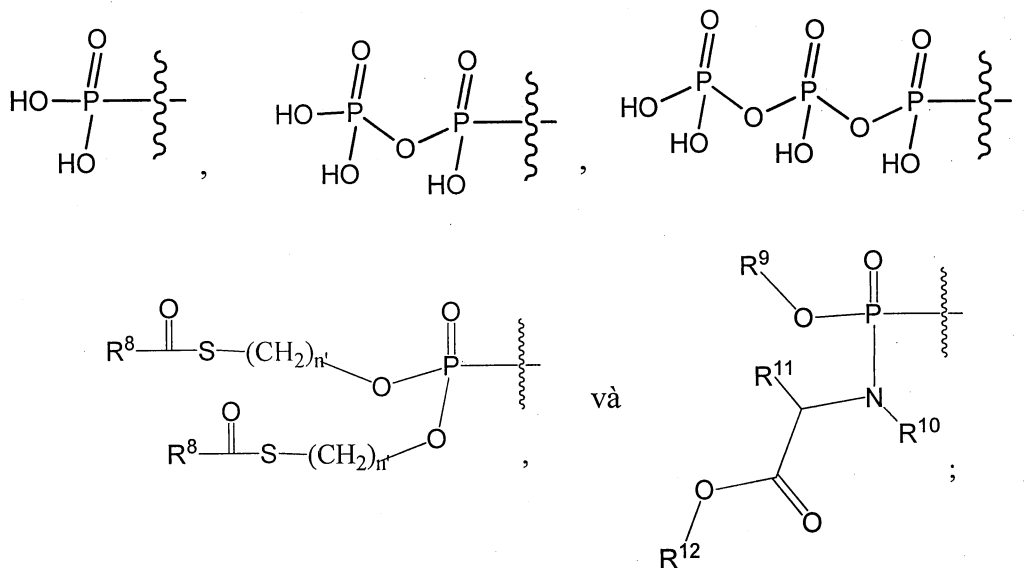


trong đó:

R^3 là OH hoặc F;

R^4 là CN, C_1 - C_4 alkyl, C_2 - C_4 alkenyl, C_2 - C_4 alkynyl, C_3 - C_4 xycloalkyl, azido, halogen, hoặc C_1 - C_2 haloalkyl;

R^5 được chọn từ nhóm gồm H và:



trong đó:

n' được chọn từ 1, 2, 3, và 4;

R^8 được chọn từ C_1 - C_8 alkyl, -O- C_1 - C_8 alkyl, benzyl, -O-benzyl, -CH₂- C_3 - C_6 xycloalkyl, -O-CH₂- C_3 - C_6 xycloalkyl, và CF₃;

R^9 là phenyl;

R^{10} được chọn từ H và CH_3 ;

R^{11} được chọn từ H hoặc C_1-C_6 alkyl;

R^{12} được chọn từ H, C_1-C_8 alkyl, benzyl, C_3-C_6 xycloalkyl, và $-CH_2-C_3-C_6$ xycloalkyl.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^3 là OH hoặc F;

R^4 là CN, metyl, etyl, etenyl, etynyl, azido, F, Cl, $-CH_2Cl$, $-CH_2F$, $-CHF_2$, hoặc $-CF_3$;

và R^5 và tất cả các nhóm khác là như đã được xác định đối với công thức (II).

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là F.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là OH.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là F và R^4 là CN.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là OH và R^4 là CN.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó cả R^1 và R^2 đều là H, R^3 là F, và R^4 là metyl, etyl, vinyl, hoặc etynyl.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là OH, và R^4 là metyl, etyl, vinyl, hoặc etynyl.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là F và R^4 là halometyl.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^3 là OH và R^4 là halometyl.

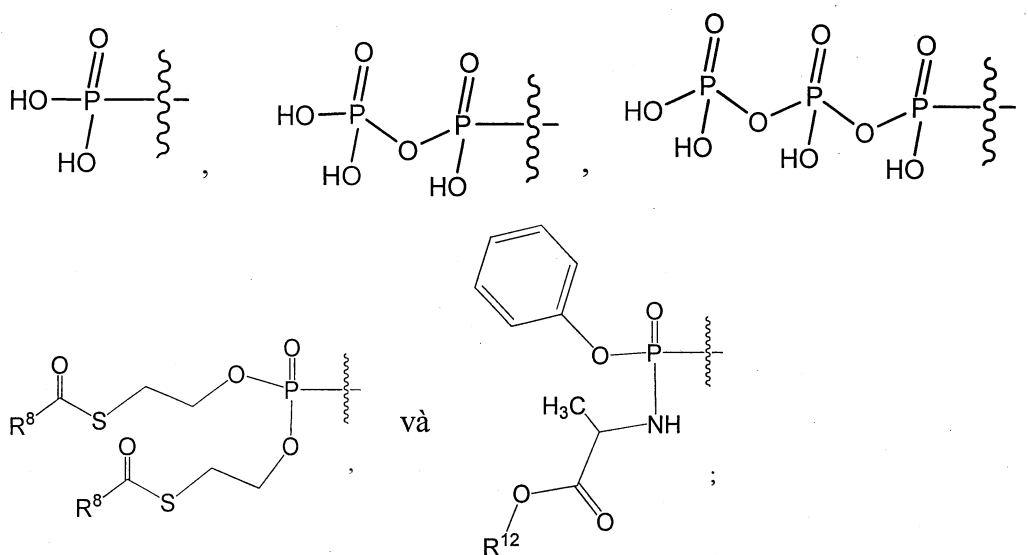
Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^5 là H.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó mỗi R^5 là H, R^3 là OH, và R^4 là methyl, etyl, vinyl, hoặc etynyl.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^5 là H, R^3 là F, và R^4 là halometyl.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (II) hoặc muối được dụng của nó, như trên, trong đó R^5 là H, R^3 là OH, và R^4 là halometyl.

Trong mỗi phương án trong số các phương án nêu trên đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của chúng, trong đó R^5 có thể không là H, còn có phương án khác nữa, trong đó tất cả các biến khác là như bộc lộ cho phương án này và R^5 được chọn từ nhóm bao gồm:



trong đó:

R^8 được chọn từ C_1 - C_8 alkyl, $-O$ - C_1 - C_8 alkyl, benzyl, và $-CH_2$ - C_3 - C_6 xycloalkyl;
và

R^{12} được chọn từ C_1 - C_8 alkyl, benzyl, C_3 - C_6 xycloalkyl, và $-CH_2$ - C_3 - C_6 xycloalkyl.

Trong mỗi phương án trong số các phương án được bộc lộ trên đây, còn có phương án khác đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của chúng, trong đó tất cả các biến khác là như đã được bộc lộ trên đây, chỉ khác là từng R^8 và R^9 được chọn từ C_1 - C_8 alkyl. Trong mỗi phương án trong số các phương án đã được bộc lộ trong câu cuối cùng trên đây, còn có phương án khác đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của chúng, trong đó tất cả các biến khác là như đã được bộc lộ trên đây, chỉ khác là từng R^8 và R^9 được chọn từ C_1 - C_6 alkyl. Trong mỗi phương án trong số các phương án đã được bộc lộ trong câu cuối cùng trên đây, còn có phương án khác đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của chúng, trong đó tất cả các biến khác là như đã được bộc lộ trên đây, chỉ khác là từng R^8 và R^9 được chọn từ C_1 - C_5 alkyl. Trong mỗi phương án trong số các phương án đã được bộc lộ trong câu cuối cùng trên đây, còn có phương án khác đề xuất hợp chất có công thức (II), hoặc muối được dụng của chúng, trong đó tất cả các biến khác là như đã được bộc lộ trên đây, chỉ khác là từng R^8 và R^9 được chọn từ C_1 - C_4 alkyl.

Trong mỗi phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này về hợp chất có công thức (I) hoặc có công thức (II), còn có phương án khác nữa, trong đó tất cả các biến là như đã được xác định cho phương án cụ thể và còn thỏa mãn rằng nếu R^3 là F thì R^4 không là methyl.

Định nghĩa

Các thuật ngữ halo và halogen được dùng để chỉ nguyên tử halogen được chọn từ F, Cl, Br, và I.

Thuật ngữ “azido” được dùng để chỉ nhóm azit, tức là nhóm $-N_3$. Thuật ngữ “n” được dùng trong bản mô tả này để chỉ số nguyên, như số nguyên được chọn từ 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, và 20, tức là 2 đến 20 hoặc từ 2 đến 20. Trong một số trường hợp, “n” được dùng để chỉ nhóm các số nguyên như 1 đến 3, 1 đến 4, 1 đến 6, 1 đến 8, 2 đến 4, 2 đến 6, 2 đến 8, v.v..

Thuật ngữ “haloalkyl” được dùng trong bản mô tả này để chỉ alkyl như được xác định trong bản mô tả này, trong đó từng nguyên tử trong số một hoặc nhiều nguyên tử hydro được thế bằng phần tử thế halo. Ví dụ, (C_1-C_6) haloalkyl là (C_1-C_6) alkyl, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử hydro được thế bằng phần tử thế halo. Khoảng này bao gồm một phần tử thế halo trên nhóm alkyl để hoàn thành quá trình halogen hóa nhóm alkyl này.

Thuật ngữ “ (C_{1-n}) haloalkyl” được dùng trong bản mô tả này, trong đó n là số nguyên, riêng rẽ hoặc kết hợp với gốc khác, nhằm để chỉ gốc alkyl có 1 đến n nguyên tử cacbon như đã nêu trên, trong đó từng nguyên tử trong số một hoặc nhiều nguyên tử hydro được thế bằng phần tử thế halo. Các ví dụ về (C_{1-n}) haloalkyl, trong đó n bằng 2 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, clometyl, cloetyl, đicloetyl, bromometyl, bromoetyl, đibromoetyl, flometyl, điflometyl, triflometyl, floetyl và đifloetyl.

Thuật ngữ “ (C_{1-n}) alkyl” được dùng trong bản mô tả này, trong đó n là số nguyên, riêng rẽ hoặc kết hợp với gốc khác, nhằm để chỉ các gốc alkyl mạch không vòng, mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 1 đến n nguyên tử cacbon. “ (C_{1-4}) alkyl” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl, etyl, propyl (n-propyl), butyl (n-butyl), 1-metyletyl (iso-propyl), 1-metylpropyl (sec-butyl), 2-metylpropyl (iso-butyl), và 1,1-đimetyletyl (Tert-butyl hoặc t-butyl). Chữ viết tắt Me biểu thị nhóm metyl; Et biểu thị nhóm etyl, Pr biểu thị nhóm propyl, iPr biểu thị nhóm 1-metyletyl, Bu biểu thị nhóm butyl và tBu biểu thị nhóm 1,1-đimetyletyl.

Thuật ngữ “alkyl” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hydrocacbon chứa các nguyên tử bậc nhất, bậc hai hoặc bậc ba. Ví dụ, nhóm alkyl có thể có 1 đến 4 nguyên tử cacbon (tức là (C_1-C_4) alkyl), 1 đến 3 nguyên tử cacbon (tức là (C_1-C_3) alkyl), hoặc 1 hoặc 2 nguyên tử cacbon (tức là (C_1-C_2) alkyl). Các ví dụ về nhóm alkyl thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl (Me, $-CH_3$), etyl (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propyl (n-Pr, n-propyl, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propyl (i-Pr, i-propyl, $-CH(CH_3)_2$), 1-butyl (n-Bu, n-butyl, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metyl-1-propyl (i-Bu, i-butyl, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butyl (s-Bu, s-butyl, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), và 2-metyl-2-propyl (t-Bu, t-butyl, $-C(CH_3)_3$). Thuật ngữ

“alkyl” còn được dùng để chỉ gốc hydrocarbon no, mạch nhánh hoặc mạch thẳng có hai tâm gốc hóa trị một thu được bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro ra khỏi cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau của alkan gốc. Các gốc alkyl điển hình bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metylen ($-\text{CH}_2-$), 1,1-etyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,2-etyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,1-propyl ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$), 1,2-propyl ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,3-propyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-butyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkenyl” có nghĩa là hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai hoặc bậc ba với ít nhất một vị trí không no, tức là liên kết đôi cacbon-cacbon, sp^2 . Ví dụ, nhóm alkenyl có thể có từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon (tức là C_2 - C_4 alkenyl), hoặc 2 đến 3 nguyên tử cacbon (tức là C_2 - C_3 alkenyl). Các ví dụ về nhóm alkenyl thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etylen hoặc vinyl ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) và alyl ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

Thuật ngữ “ (C_{2-n}) alkenyl” được dùng trong bản mô tả này, trong đó n là số nguyên, riêng rẽ hoặc kết hợp với gốc khác, nhằm để chỉ gốc không no, gốc không vòng mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ hai đến n nguyên tử cacbon, ít nhất hai nguyên tử trong số đó liên kết với nhau bằng liên kết đôi. Các ví dụ về gốc này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etenyl (vinyl), 1-propenyl, 2-propenyl, và 1-butenyl. Trừ khi có quy định cụ thể khác, thuật ngữ “ (C_{2-n}) alkenyl” được hiểu là bao gồm từng chất đồng phân lập thể nếu có thể, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đồng phân(E) và (Z), và hỗn hợp của chúng. Nếu nhóm (C_{2-n}) alkenyl được thế, thì cần được hiểu là được thế trên nguyên tử cacbon bất kỳ của nó mà nếu không thì nguyên tử này mang nguyên tử hydro, trừ khi có quy định cụ thể khác, sao cho việc thay thế này tạo ra hợp chất ổn định về mặt hóa học, như nhận ra được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ “alkynyl” có nghĩa là hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa nguyên tử cacbon bậc một, bậc hai hoặc bậc ba với ít nhất một vị trí không no, tức là liên kết ba cacbon-cacbon, sp . Ví dụ, nhóm alkynyl có thể có từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon (tức là C_2 - C_4 alkynyl) hoặc 2 đến 3 nguyên tử cacbon (tức là C_2 - C_3 alkyn). Các ví dụ về nhóm alkynyl thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axetylen ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), propargyl ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “ (C_{2-n}) alkynyl”, được dùng trong bản mô tả này, trong đó n là số nguyên, riêng rẽ hoặc kết hợp với gốc khác, nhằm để chỉ gốc không no, gốc không vòng

mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ hai đến n nguyên tử cacbon, ít nhất hai trong số đó liên kết với nhau bằng liên kết ba. Các ví dụ về gốc này, trong đó n bằng 4 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etynyl, 1-propynyl, 2-propynyl, và 1-butynyl. Nếu nhóm (C_{2-n}) alkynyl được thế, thì cần được hiểu rằng được thế trên nguyên tử cacbon bất kỳ của nó mà nếu không thì nó mang nguyên tử hydro, trừ khi có quy định cụ thể khác, sao cho việc thế này tạo ra hợp chất ổn định về mặt hóa học, như nhận ra được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ xycloalkyl được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm vòng béo. Các nhóm xycloalkyl theo sáng chế có thể được đề cập đến theo số lượng nguyên tử cacbon trong nhân của chúng, như “ C_3 - C_4 xycloalkyl” có nghĩa là nhân xycloalkyl với 3 hoặc 4 nguyên tử cacbon trên nhân hoặc “ C_3 - C_6 xycloalkyl” biểu thị nhân xycloalkyl với 3, 4, 5, hoặc 6 nguyên tử cacbon trên nhân, tức là nhân xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, hoặc xyclohexyl.

Thuật ngữ “vòng cacbon” hoặc “carboxycyl” được dùng trong bản mô tả này để chỉ vòng no (tức là xycloalkyl) hoặc vòng không no một phần (ví dụ, xycloalkenyl, xycloalkadienyl, v.v.) có số lượng nguyên tử cacbon được chỉ định, như 3 đến 4 nguyên tử cacbon hoặc 3 đến 6 nguyên tử cacbon như hệ nhân một vòng. Theo một phương án, vòng cacbon là một vòng chứa 3 đến 6 nguyên tử cacbon của nhân (tức là vòng cacbon (C_3 - C_6)). Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các vòng cacbon một vòng bao gồm các nhân xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, 1-xyclopent-1-enyl, 1-xyclopent-2-enyl, 1-xyclopent-3-enyl, xyclohexyl, 1-xyclohex-1-enyl, 1-xyclohex-2-enyl, 1-xyclohex-3-enyl, và xyclohexa-1,3-dienyl.

Mỗi nhóm carboxycyl có thể được thế bằng 0, 1, 2, hoặc 3 phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, -OH, -CN, -NO₂, -NH₂, -NH(C_1 - C_6 alkyl), -N(C_1 - C_6 alkyl)₂, C_1 - C_6 alkyl, C_1 - C_6 alkoxy, và -CF₃.

Dược phẩm

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt dược tính của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng, solvat, và/hoặc este của chúng, và chất mang dược dụng hoặc tá dược. Sáng chế còn đề xuất các dược phẩm riêng rẽ, mỗi dược phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt dược tính của hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số

các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và chất mang được dụng hoặc tá được.

Các hợp chất theo sáng chế được bào chế với các chất mang thông thường và các tá được, mà sẽ được chọn phù hợp với thực tiễn thông thường. Các viên nén sẽ chứa các tá được, các chất gây trượt, các chất độn, các chất kết dính và các chất tương tự. Các chế phẩm trong nước được bào chế ở dạng vô trùng, và khi được nhằm để phân phối theo đường dùng không qua đường miệng thường sẽ là đẳng trương. Tất cả các chế phẩm sẽ tùy ý chứa các tá được như loại nêu trong tài liệu: "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Các tá được bao gồm axit ascorbic và các chất chống oxy hóa khác, các chất chelat hóa như EDTA, các hydrat cacbon như dextran, hydroxyalkylxenluloza, hydroxyalkylmetylxenluloza, axit stearic và các chất tương tự. Độ pH của các chế phẩm nằm trong khoảng từ 3 đến 11, song thường nằm trong khoảng từ 7 đến 10.

Mặc dù các hoạt chất có thể được dùng riêng rẽ, tốt hơn nếu chúng ở dạng được phẩm. Các chế phẩm này, kể cả dạng dùng trong cho thú y và dùng cho người, chứa ít nhất một hoạt chất, như nêu trên, cùng với một hoặc nhiều chất mang chấp nhận được và tùy ý các thành phần điều trị khác, đặc biệt là các thành phần điều trị bổ sung như đã nêu trong bản mô tả này. Các chất mang phải là "chấp nhận được" theo nghĩa là tương thích với các thành phần khác của chế phẩm và không độc về mặt sinh lý đối với người nhận của chúng.

Các chế phẩm bao gồm loại thích hợp đối với các đường dùng nêu trên. Các chế phẩm có thể được trình bày một cách thuận tiện ở dạng liều đơn vị và có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực dược học. Các kỹ thuật và các chế phẩm thường được tìm thấy trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Các phương pháp này bao gồm bước kết hợp hoạt chất với chất mang mà cấu thành một hoặc nhiều thành phần phụ trợ. Nói chung, các chế phẩm được bào chế bằng cách kết hợp một cách đồng đều và kỹ hoạt chất với các chất mang lỏng hoặc các chất mang rắn đã được nghiền mịn hoặc cả hai, và sau đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm.

Các chế phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng có thể được trình bày ở dạng các đơn vị riêng rẽ như các viên nang, các viên con nhộng hoặc các viên nén, mỗi viên

chứa lượng đã định trước của hoạt chất; ở dạng bột hoặc hạt; ở dạng dung dịch hoặc huyền phù trong nước hoặc chất lỏng không nước; hoặc ở dạng nhũ tương lỏng dầu-trong-nước hoặc nhũ tương lỏng nước-trong-dầu. Hoạt chất còn có thể được dùng ở dạng viên thuốc to, thuốc tễ hoặc dạng sệt.

Viên nén được tạo ra bằng cách nén hoặc đúc, tùy ý với một hoặc nhiều thành phần phụ trợ. Các viên nén đã được nén có thể được bào chế bằng cách nén trong máy thích hợp hoạt chất ở dạng chảy tự do như bột hoặc hạt, được tùy ý trộn với chất kết dính, chất làm trơn, chất pha loãng trợ, chất bảo quản, tác nhân phân tán hoặc tác nhân hoạt động bề mặt. Các viên nén đúc có thể được tạo ra bằng cách đúc trong máy thích hợp hỗn hợp gồm hoạt chất dạng bột đã được làm ẩm với chất pha loãng lỏng trợ. Các viên nén có thể tùy ý được bao hoặc khóa và tùy ý được bào chế sao cho gây ra sự giải phóng chậm hoặc giải phóng có kiểm soát hoạt chất ra khỏi viên đó.

Đối với các lây nhiễm ở mắt hoặc các mô khác bên ngoài, ví dụ miệng và da, tốt hơn nếu các chế phẩm được bôi lên ở dạng dầu bôi hoặc kem bôi khu trú chứa (các) hoạt chất với lượng, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,075% đến 20% trọng lượng (kể cả (các) hoạt chất nằm trong khoảng từ 0,1% đến 20% với mức gia tăng là 0,1% trọng lượng như 0,6% trọng lượng, 0,7% trọng lượng, v.v.), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2% đến 15% trọng lượng và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10% trọng lượng. Khi được bào chế trong dầu bôi, các hoạt chất có thể được dùng với nền dầu bôi chứa parafin hoặc nền dầu bôi trộn lẫn được với nước. Theo cách khác, các hoạt chất có thể được bào chế ở dạng kem bôi có nền kem bôi dầu-trong-nước.

Nếu muốn, pha nước của nền kem bôi có thể chứa, ví dụ, ít nhất 30% trọng lượng rượu polyhydric, tức là rượu có hai hoặc nhiều nhóm hydroxyl như propylen glycol, butan 1,3-diol, manitol, sorbitol, glyxerol và polyetylen glycol (kể cả PEG 400) và hỗn hợp của chúng. Các dược phẩm dùng khu trú có thể mong muốn chứa hợp chất mà làm gia tăng mức độ hấp thụ hoặc mức độ thấm của hoạt chất qua da hoặc các vùng khác bị bệnh. Các ví dụ về chất tăng cường thấm qua da bao gồm dimetyl sulphoxit và các chất tương tự có liên quan.

Pha dầu của nhũ tương có thể được cấu thành từ các thành phần đã biết theo cách đã biết. Trong khi pha này có thể chỉ bao gồm chất nhũ hóa (còn được gọi là tác nhân nhũ

hóa), mong muốn rằng nó chứa hỗn hợp gồm ít nhất một chất nhũ hóa với mỡ hoặc dầu hoặc với cả mỡ và dầu. Tốt hơn, nếu chất nhũ hóa ưa nước được bao gồm cùng với chất nhũ hóa ưa béo mà hoạt động như chất làm ổn định. Còn tốt hơn, nếu nó bao gồm cả dầu và mỡ. Các chất nhũ hóa cùng hoặc không cùng các chất làm ổn định tạo ra chế phẩm được gọi là sáp nhũ hóa, và sáp cùng với dầu và mỡ tạo ra chế phẩm được gọi là nền của dầu bôi nhũ hóa mà tạo ra pha phân tán dầu của các chế phẩm kem bôi.

Các tác nhân nhũ hóa và các chất làm ổn định nhũ tương thích hợp để dùng trong việc bào chế bao gồm Tween® 60, Span® 80, rượu xetostearylic, rượu benzylic, rượu myristylic, glyxeryl mono-stearat và natri lauryl sulfat.

Việc lựa chọn dầu hoặc mỡ thích hợp để bào chế dựa trên cơ sở đạt được các đặc tính mong muốn khi dùng làm mỹ phẩm. Tốt hơn, nếu kem bôi là sản phẩm không nhờn, không gây ra vết màu và dễ rửa với độ đặc thích hợp để tránh chảy ra khỏi ống hoặc vật chứa khác. Các este của alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, monoaxit hoặc điaxit như diisoadipat, isoxetyl stearat, propylen glycol dieste của các axit béo từ dừa, isopropyl myristat, dexyl oleat, isopropyl palmitat, butyl stearat, 2-ethylhexyl palmitat hoặc hỗn hợp bao gồm các este mạch nhánh được gọi là Crodamol CAP có thể được sử dụng, ba este cuối cùng là các este được ưu tiên. Chúng có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp tùy theo các tính chất cần thiết. Theo cách khác, lipid có nhiệt độ nóng chảy cao như parafin mềm trắng và/hoặc parafin lỏng hoặc dầu khoáng khác được sử dụng.

Các dược phẩm theo sáng chế bao gồm sự kết hợp một hoặc nhiều chất mang hoặc tá dược được dùng và tùy ý các dược chất khác để điều trị bệnh cùng với nhau. Dược phẩm chứa hoạt chất có thể ở dạng bất kỳ thích hợp đối với phương pháp dùng được dự định. Khi được sử dụng để dùng qua đường miệng ví dụ, ở dạng viên nén, viên đẹt, viên ngậm, huyền phù trong nước hoặc trong dầu, bột hoặc hạt có thể phân tán được, nhũ tương, viên nang cứng hoặc viên nang mềm, dung dịch, siro hoặc cồn ngọt có thể được bào chế. Các dược phẩm nhằm để dùng qua đường miệng có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bào chế dược phẩm và các dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều tác nhân bao gồm các chất tạo ngọt, các tác nhân tạo vị, các tác nhân tạo màu và các chất bảo quản, để tạo ra chế phẩm dễ chấp nhận. Các viên nén chứa hoạt chất trong hỗn hợp với tá dược được dùng không độc mà là thích hợp để sản xuất

viên nén là chấp nhận được. Ví dụ, các tá dược này có thể là các chất pha loãng trợ, như canxi hoặc natri cacbonat, lactoza, canxi hoặc natri phosphat; các tác nhân nghiền hạt và các chất gây rã, như tinh bột ngô, hoặc axit alginic; các tác nhân liên kết như tinh bột, gelatin hoặc acacia; và các tác nhân làm trơn như magie stearat, axit stearic hoặc talc. Các viên nén có thể không được bao hoặc có thể được bao theo các kỹ thuật đã biết bao gồm vi bọc để trì hoãn sự phân rã và hấp phụ trong dải dạ dày-ruột non và bằng cách đó tạo ra tác dụng kéo dài trong thời gian dài. Ví dụ, chất liệu giải phóng chậm như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat riêng rẽ hoặc cùng với sáp có thể được sử dụng.

Các chế phẩm để dùng qua đường miệng cũng có thể được trình bày ở dạng viên nang gelatin cứng mà trong đó hoạt chất được trộn với chất pha loãng rắn trợ, ví dụ, canxi phosphat hoặc cao lanh, hoặc ở dạng viên nang gelatin mềm trong đó hoạt chất được trộn với môi trường nước hoặc môi trường dầu, như dầu lạc, parafin lỏng hoặc dầu ô liu.

Các loại huyền phù trong nước chứa các hoạt chất trong hỗn hợp với các tá dược thích hợp để sản xuất các loại huyền phù nước. Các tá dược này bao gồm tác nhân tạo huyền phù, như natri carboxymethylxenluloza, methylxenluloza, hydroxypropyl methylxenluloza, natri alginat, polyvinylpyrrolidon, gôm tragacan và gôm acacia, và các tác nhân phân tán hoặc các tác nhân thấm ướt như phosphatit có trong tự nhiên (ví dụ, lexitin), sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo (ví dụ, polyoxyetylen stearat), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (ví dụ, heptadecaetylenoxyxetanol), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với este một phần thu được từ axit béo và hexitol anhydrit (ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat). Huyền phù nước còn có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản như etyl hoặc n-propyl p-hydroxy-benzoat, một hoặc nhiều tác nhân tạo màu, một hoặc nhiều tác nhân tạo vị và một hoặc nhiều chất tạo ngọt, như sucroza hoặc sacarin.

Các loại huyền phù dầu có thể được điều chế bằng cách tạo huyền phù hoạt chất trong dầu thực vật, như dầu lạc, dầu ô liu, dầu vừng hoặc dầu dừa, hoặc trong dầu khoáng như parafin lỏng. Các loại huyền phù qua đường miệng có thể chứa tác nhân làm đặc, như sáp ong, parafin cứng hoặc rượu xetylic. Các chất tạo ngọt, như các chất nêu trên, và các tác nhân tạo vị có thể được bổ sung vào để tạo ra chế phẩm dễ chấp nhận qua đường

miệng. Các dược phẩm này có thể được bảo quản bằng cách bổ sung chất chống oxy hóa như axit ascorbic vào.

Bột và hạt dễ phân tán thích hợp để điều chế huyền phù trong nước bằng cách bổ sung nước vào tạo ra hoạt chất trong hỗn hợp với tác nhân phân tán hoặc tác nhân thấm ướt, tác nhân tạo huyền phù, và một hoặc nhiều chất bảo quản. Tác nhân phân tán hoặc tác nhân thấm ướt hoặc tác nhân tạo huyền phù thích hợp được minh họa bằng ví dụ là các chất đã nêu trên. Các tá dược bổ sung, ví dụ, chất tạo ngọt, chất tạo vị và tác nhân tạo màu, cũng có thể có mặt.

Các dược phẩm còn có thể ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật, như dầu oliu hoặc dầu lạc, dầu khoáng, như parafin lỏng, hoặc hỗn hợp của chúng. Các tác nhân nhũ hóa thích hợp bao gồm các loại gồm có trong tự nhiên, như gồm acaxia và gồm tragacan, các phosphatit có trong tự nhiên, như lexitin của đậu nành, các este hoặc các este một phần thu được từ các axit béo và các hexitol anhydrit, như sorbitan monooleat, và các sản phẩm ngưng tụ của các este một phần này với etylen oxit, như polyoxyetylen sorbitan monooleat. Nhũ tương còn có thể chứa chất tạo ngọt và chất tạo vị. Các siro và các loại cồn ngọt có thể được điều chế với các chất tạo ngọt, như glyxerol, sorbitol hoặc sucroza. Các chế phẩm này còn có thể chứa chất làm dịu, chất bảo quản, chất tạo vị hoặc chất tạo màu.

Các dược phẩm có thể ở dạng chế phẩm vô trùng dùng để tiêm hoặc dùng qua đường tĩnh mạch, như huyền phù trong nước hoặc dầu vô trùng để tiêm. Huyền phù này có thể được bào chế theo cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng chất phân tán hoặc chất thấm ướt hoặc chất tạo huyền phù thích hợp mà đã được nêu trên. Chế phẩm dùng để tiêm hoặc dùng qua đường tĩnh mạch vô trùng còn có thể là dung dịch hoặc huyền phù vô trùng để tiêm trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc được chấp nhận để dùng ngoài đường tiêu hóa, như dung dịch trong 1,3-butan-diol hoặc được bào chế ở dạng bột đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp. Trong số các chất dẫn và các dung môi chấp nhận được mà có thể sử dụng được là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng thường có thể được dùng làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù. Nhằm mục đích này, dầu nhẹ không bay

hơi bất kỳ có thể được sử dụng, kể cả monoglycerit hoặc diglycerit tổng hợp. Ngoài ra, các axit béo như axit oleic có thể được dùng theo cách tương tự để bào chế thuốc tiêm.

Lượng hoạt chất mà có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn thay đổi tùy theo vật chủ được điều trị bệnh và cách dùng cụ thể. Ví dụ, chế phẩm giải phóng theo thời gian nhằm để dùng qua đường miệng cho người có thể chứa khoảng từ 1mg đến 1000mg hoạt chất trộn với lượng nguyên liệu chất mang thích hợp và thuận tiện mà có thể thay đổi trong khoảng từ 5% đến 95% tổng thành phần (trọng lượng: trọng lượng). Dược phẩm có thể được bào chế để tạo ra lượng đo được dễ dàng để dùng. Ví dụ, dung dịch nước được nhằm để truyền qua đường tĩnh mạch có thể chứa 3µg đến 500µg hoạt chất trong mỗi mililit dung dịch để thực hiện việc truyền thể tích thích hợp với tốc độ khoảng 30ml/giờ.

Các chế phẩm thích hợp để dùng khu trú cho mắt còn bao gồm thuốc nhỏ mắt, trong đó hoạt chất được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong chất mang thích hợp, đặc biệt là dung môi nước cho hoạt chất. Tốt hơn, nếu hoạt chất có mặt trong các chế phẩm này ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20%, theo cách có lợi nằm trong khoảng từ 0,5% đến 10%, và cụ thể là khoảng 1,5% trọng lượng.

Các chế phẩm thích hợp để dùng khu trú trong miệng bao gồm các viên ngậm cứng chứa hoạt chất trên nền có vị, thường là sucroza và acaxia hoặc tragacan; viên ngậm mềm chứa hoạt chất trong nền trợ như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và acaxia; và nước súc miệng chứa hoạt chất trong chất mang lỏng thích hợp.

Các chế phẩm để dùng qua đường trực tràng có thể được trình bày ở dạng viên đặt trong hậu môn với nền thích hợp chứa, ví dụ, bơ cacao hoặc salixylat.

Các chế phẩm thích hợp để dùng trong phổi hoặc dùng qua đường mũi có cỡ hạt, ví dụ, nằm trong khoảng 0,1 micron đến 500 micron, như 0,5, 1, 30, 35 v.v., mà được dùng bằng cách tạo khí dung nhanh qua đường mũi hoặc bằng cách tạo khí dung qua miệng để đến được các nang của phế nang. Các chế phẩm thích hợp bao gồm dung dịch trong nước hoặc dầu chứa hoạt chất. Các chế phẩm thích hợp để dùng sol khí hoặc bột khô có thể được bào chế theo các phương pháp thông thường và có thể được phân phối

với các dược chất khác để điều trị bệnh như các hợp chất cho đến nay được dùng trong việc điều trị hoặc phòng các lây nhiễm Pneumovirinae nêu dưới đây.

Theo các phương án thực hiện khác, sáng chế đề xuất dược phẩm mới, hiệu nghiệm, an toàn, không gây kích ứng và dễ tạo khí dung tương thích về mặt sinh lý chứa hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II), hoặc muối dược dụng của chúng, thích hợp để điều trị các bệnh lây nhiễm Pneumovirinae và bệnh viêm tiểu phế quản có tiềm năng đi kèm. Các muối dược dụng được ưu tiên là các muối của axit vô cơ bao gồm hydroclorua, hydrobromua, sulfat hoặc các muối phosphat do chúng có thể gây kích ứng phổi ít hơn. Tốt hơn, nếu chế phẩm dễ khí dung được phân phối đến không gian nội phế quản trong sol khí chứa các hạt có đường kính khí động học trung bình theo khối lượng (mass median aerodynamic diameter MMAD) nằm trong khoảng từ 1µm đến 5µm. Tốt hơn, nếu hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) được bào chế để phân phối sol khí bằng cách sử dụng máy tạo khí dung, máy xông áp lực có đo liều (pMDI), hoặc máy tạo khí dung bột khô (DPI).

Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các máy tạo khí dung bao gồm các máy tạo khí dung phun mù, phun tia, siêu thanh, khí nén, tấm xấp rung, hoặc các máy tạo khí dung tương tự kể cả sử dụng công nghệ phân phối sol khí thích hợp (Denyer, J. *Aerosol medicine Pulmonary Drug Delivery* 2010, 23 Supp 1, S1-S10). Máy tạo khí dung phun tia sử dụng áp lực không khí để phá vỡ dung dịch lỏng thành các giọt sol khí. Máy tạo khí dung siêu thanh vận hành nhờ tính thể áp điện mà chia cắt chất lỏng thành các giọt sol khí nhỏ. Hệ thống khí dung sử dụng khí nén buộc dung dịch ở áp suất thông qua các lỗ rỗng nhỏ để tạo ra các giọt sol khí. Cơ cấu tấm xấp rung sử dụng chuyển động rung nhanh để chia cắt dòng chất lỏng thành các cỡ giọt thích hợp.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm dùng để tạo khí dung được phân phối đến không gian nội phế quản ở dạng sol khí chứa các hạt với MMAD chủ yếu là nằm trong khoảng từ 1µm và khoảng 5µm bằng cách sử dụng máy tạo khí dung có khả năng sol khí hóa chế phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) thành các hạt có MMAD theo yêu cầu. Để trở nên hữu hiệu tối ưu nhằm mục đích điều trị bệnh và để tránh các tác dụng phụ đối với đường hô hấp trên và đường nội hấp, phần lớn các hạt được sol khí hóa sẽ không được có MMAD lớn hơn khoảng 5µm. Nếu sol khí chứa nhiều hạt có

MMAD lớn hơn $5\mu\text{m}$, thì các hạt bị đọng lại ở đường hô hấp trên làm giảm lượng thuốc đã được phân phối đến vị trí viêm và co phế quản ở đường hô hấp dưới. Nếu MMAD của sol khí là nhỏ hơn khoảng $1\mu\text{m}$, thì các hạt có xu hướng vẫn được tạo huyền phù trong không khí được tạo khí dung và cuối cùng được tỏa ra khi thở ra.

Khi được bào chế và được phân phối theo phương pháp trong bản mô tả này, chế phẩm sol khí dùng để tạo khí dung phân phối liều có hiệu quả điều trị của hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) đến vị trí nhiễm Pneumovirinae đủ để điều trị tình trạng nhiễm Pneumovirinae. Lượng thuốc được dùng phải được điều chỉnh để thể hiện hiệu quả của việc phân phối liều có hiệu quả điều trị của hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II). Theo phương án được ưu tiên, việc kết hợp chế phẩm sol khí trong nước với máy tạo khí dung phun mù, phun tia, khí nén, tấm xấp rung, hoặc siêu thanh cho phép, tùy theo máy tạo khí dung, phân phối khoảng, ít nhất 20%, đến 90%, thường là khoảng 70% liều được dùng của hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) vào trong đường không khí. Theo phương án được ưu tiên, ít nhất khoảng 30% đến 50% hoạt chất được phân phối. Tốt hơn nữa, khoảng từ 70% đến 90% hoạt chất được phân phối.

Theo phương án khác, hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) hoặc muối được dùng của nó, được phân phối ở dạng bột khô dễ xông. Các hợp chất được dùng nội khí quản như chế phẩm bột khô để phân phối một cách hiệu quả các hạt mịn của hợp chất vào trong không gian nội phế quản bằng cách sử dụng bột khô hoặc các máy xông có đo liều. Để phân phối bằng DPI, hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) được xử lý thành các hạt chủ yếu có MMAD nằm trong khoảng từ $1\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$ bằng cách nghiền sấy phun, xử lý chất lỏng tới hạn, hoặc kết tủa khỏi dung dịch. Các thiết bị và các quy trình nghiền trong môi trường, nghiền phun tia và sấy phun có khả năng tạo ra kích thước hạt MMAD nằm trong khoảng từ $1\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$ là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, các tá dược được bổ sung vào hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) trước khi xử lý thành các hạt có cỡ theo yêu cầu. Theo phương án khác, các tá dược được trộn với các hạt có cỡ theo yêu cầu để hỗ trợ việc phân tán các hạt thuốc, ví dụ, bằng cách sử dụng lactoza làm tá dược.

Việc xác định cỡ hạt được thực hiện bằng cách sử dụng các thiết bị đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, búa đập chu trình Anderson đa giai đoạn hoặc phương pháp

thích hợp khác như các phương pháp được viện dẫn cụ thể trong Chương 601 của Dược điển Mỹ như các thiết bị chuyên dụng dành cho các sol khí bên trong máy tạo khí dung đo liều và máy tạo khí dung bột khô.

Theo phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) được phân phối ở dạng bột khô bằng cách sử dụng dụng cụ như máy tạo khí dung bột khô hoặc các thiết bị phân tán bột khô khác. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các máy tạo khí dung bột khô và các thiết bị bao gồm các loại đã bộc lộ trong các bằng sáng chế số US5,458,135; US5,740,794; US5775320; US5,785,049; US3,906,950; US4,013,075; US4,069,819; US4,995,385; US5,522,385; US4,668,218; US4,667,668; US4,805,811 và US5,388,572. Các máy tạo khí dung bột khô có hai thiết kế chính. Một thiết kế là thiết bị đo, trong đó nguồn chứa thuốc được đặt bên trong thiết bị và bệnh nhân bổ sung liều thuốc vào trong buồng tạo khí dung. Thiết kế thứ hai là thiết bị đo tại nhà máy, trong đó mỗi liều đơn được sản xuất trong vật chứa riêng biệt. Cả hai thiết bị này đều phụ thuộc vào việc bào chế thuốc thành các hạt nhỏ có MMAD nằm trong khoảng từ 1µm đến 5µm và thường liên quan đến việc bào chế đồng thời với các hạt tá dược lớn hơn như, nhưng không chỉ giới hạn ở, lactoza. Thuốc bột được đặt trong buồng tạo khí dung (nhờ thiết bị đo hoặc bằng cách phá vỡ liều sản xuất tại nhà máy) và dòng hít vào của bệnh nhân thúc đẩy bột ra khỏi thiết bị và vào khoang miệng. Các đặc tính dòng không phân lớp của đường bột làm cho tá dược-thuốc kết tụ lại để phân hủy, và khối lượng của các hạt tá dược lớn gây ra tác động của chúng ở sau cổ họng, trong khi các hạt thuốc nhỏ hơn được tích tụ sâu trong phổi. Theo các phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II), hoặc muối dược dụng của chúng, được phân phối ở dạng bột khô bằng cách sử dụng một trong hai loại máy tạo khí dung bột khô như được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó MMAD của bột khô, ngoại trừ các tá dược bất kỳ, chủ yếu là nằm trong khoảng 1µm đến 5µm.

Theo phương án khác, hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) được phân phối ở dạng bột khô bằng cách sử dụng máy xông có đo liều. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các máy xông có đo liều và các thiết bị bao gồm các loại đã bộc lộ trong các bằng sáng chế số US5,261,538; US5,544,647; US5,622,163; US4,955,371; US3,565,070; US3,361,306 và US6,116,234. Theo các phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II), hoặc muối dược dụng của chúng, được phân phối ở

dạng bột khô bằng cách sử dụng máy xông có đo liều trong đó MMAD của bột khô, ngoại trừ các tá dược bất kỳ, chủ yếu là nằm trong khoảng từ 1µm đến 5µm.

Các chế phẩm thích hợp để dùng qua đường âm đạo có thể được trình bày ở dạng viên đặt âm đạo, tampon, kem bôi, gel, bột nhào, chế phẩm bột hoặc chế phẩm xịt mà ngoài hoạt chất còn chứa chất mang đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là thích hợp.

Các chế phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng trong nước và không trong nước, mà có thể chứa chất chống oxy hóa, dung dịch đệm, chất kháng khuẩn và chất tan mà khiến cho chế phẩm đẳng trương với máu của người nhận dự kiến; và các loại huyền phù vô trùng trong nước và không trong nước mà có thể chứa tác nhân tạo huyền phù và tác nhân làm đặc.

Các chế phẩm được trình bày trong vật chứa liều đơn hoặc đa liều, ví dụ, ống thuốc tiêm và lọ nhỏ bịt kín, và có thể được bảo quản trong tình trạng đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp (đã được làm đông khô) chỉ cần bổ sung chất mang lỏng vô trùng, ví dụ, nước để tiêm, ngay trước khi dùng. Dung dịch và huyền phù tiêm tức thì được bào chế từ các loại bột, hạt và viên nén vô trùng thuộc loại đã được bộc lộ trước đây. Các chế phẩm ở dạng liều đơn vị được ưu tiên là các chế phẩm chứa hoạt chất với liều hằng ngày hoặc phân liều hằng ngày theo đơn vị, như được nêu trên trong bản mô tả này, hoặc phân đoạn thích hợp của chúng.

Cần phải hiểu rằng ngoài các thành phần cụ thể nêu trên, các chế phẩm có thể chứa các tác nhân thông thường khác trong lĩnh vực kỹ thuật này mà liên quan đến loại chế phẩm liên quan, ví dụ, các chế phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng có thể chứa các tác nhân tạo vị.

Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm để dùng trong thú y chứa ít nhất một hoạt chất như nêu trên cùng với chất mang để dùng trong thú y cùng với nó.

Các chất mang để dùng trong thú y là các nguyên liệu hữu ích nhằm mục đích dùng được phẩm này và có thể là nguyên liệu rắn, lỏng hoặc khí mà nói cách khác là tro hoặc được chấp nhận trong lĩnh vực thú y và là tương thích với hoạt chất. Các dược phẩm thú y này có thể được dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa hoặc theo đường mong muốn bất kỳ khác.

Các hợp chất theo sáng chế được dùng để giải phóng có kiểm soát dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất làm hoạt chất ("các chế phẩm giải phóng có kiểm soát"), trong đó mức độ giải phóng hoạt chất được kiểm soát và điều chỉnh để cho phép cấp liều ở tần suất ít hơn hoặc để cải thiện biên dạng dược động học hoặc độc tính của hoạt chất đã định.

Liều hiệu quả của hoạt chất phụ thuộc ít nhất vào bản chất của tình trạng bệnh lý được điều trị, độc tính, hợp chất này được sử dụng nhằm mục đích phòng bệnh (liều thấp hơn) hoặc chống nhiễm virus hoạt tính, phương pháp phân phối, và dược phẩm, và sẽ được xác định bởi bác sĩ lâm sàng bằng cách áp dụng các nghiên cứu tăng liều thông thường. Có thể mong đợi liều lượng nằm trong khoảng từ 0,0001mg/kg đến 100mg/kg thể trọng hàng ngày; thường nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 10mg/kg thể trọng hàng ngày; thông thường hơn nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 5mg/kg thể trọng hàng ngày; thông thường nhất nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 0,5mg/kg thể trọng hàng ngày. Ví dụ, liều hàng ngày dự định đối với người lớn có thể trọng khoảng 70kg sẽ nằm trong khoảng từ 1mg đến 1000mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5mg đến 500mg, và có thể ở dạng một hoặc nhiều liều.

Đường dùng

Một hoặc nhiều hợp chất (trong bản mô tả này được gọi là hoạt chất) được dùng theo đường dùng bất kỳ thích hợp với tình trạng bệnh lý cần được điều trị. Các đường dùng thích hợp bao gồm các đường miệng, trực tràng, mũi, phổi, khu trú (kể cả trong má và dưới lưỡi), âm đạo và ngoài đường tiêu hóa (kể cả dưới da, tiêm bắp, tĩnh mạch, trong da, nội tủy mạch và ngoài màng cứng), và các đường dùng tương tự. Có thể thấy rằng đường dùng được ưu tiên có thể thay đổi theo tình trạng của người nhận chẳng hạn. Ưu điểm của các hợp chất theo sáng chế là ở chỗ chúng là sinh khả dụng qua đường miệng và có thể được định liều qua đường miệng.

Phép điều trị kết hợp

Các dược phẩm còn được sử dụng kết hợp với các hoạt chất khác. Để điều trị các bệnh nhiễm virus Pneumovirinae, tốt hơn nếu hoạt chất khác để điều trị có hoạt tính chống lại các bệnh nhiễm virus Pneumovirinae, đặc biệt là các nhiễm virus hợp bào hô

hấp. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các hoạt chất điều trị bệnh khác này là ribavirin, palivizumab, motavizumab, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444 (còn được gọi là RSV604), MDT-637, BMS-433771, ALN-RSV0, ALX-0171 và hỗn hợp của chúng.

Nhiều bệnh nhiễm virus Pneumovirinae là các bệnh nhiễm đường hô hấp. Do đó, các hoạt chất điều trị bổ sung được dùng để điều trị các triệu chứng hô hấp và các di chứng của bệnh nhiễm có thể được sử dụng kết hợp với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II). Tốt hơn, nếu các tác nhân bổ sung được dùng qua đường miệng hoặc bằng cách tạo khí dung trực tiếp. Ví dụ, các tác nhân điều trị bệnh bổ sung được ưu tiên khác kết hợp với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) dùng để điều trị các bệnh nhiễm virus ở đường hô hấp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thuốc giãn phế quản và các corticosteroid.

Các glucocorticoid, mà lần đầu tiên được đưa vào làm tác nhân điều trị bệnh hen năm 1950 (Carriger, *Journal of Allergy*, 21, 282-287, 1950), vẫn là cách điều trị hiệu nghiệm nhất và hiệu quả ổn định đối với bệnh này, mặc dù cơ chế hoạt động này còn chưa được hiểu rõ hoàn toàn (Morris, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 75 (1 Pt) 1-13, 1985). Tuy nhiên, các phép điều trị bằng glucocorticoid qua đường miệng liên quan đến các tác dụng phụ rất không mong muốn như bệnh béo phì ở thân, chứng cao huyết áp, bệnh tăng nhãn áp, chứng bất dung nạp glucoza, gia tăng hình thành đục thủy tinh thể, mất khoáng chất ở xương, và các tác dụng tâm lý, tất cả các tác dụng phụ này hạn chế việc sử dụng chúng làm tác nhân điều trị bệnh lâu dài (Goodman and Gilman, 10th edition, 2001). Giải pháp đối với các tác dụng phụ đường nội hấp là phân phối các thuốc steroid một cách trực tiếp đến vị trí viêm. Các corticosteroid xông được hít vào (ICS) đã được phát triển để giảm tác dụng phụ nghiêm trọng của các steroid qua đường miệng. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các corticosteroid mà có thể được dùng kết hợp với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) là dexamethason, dexamethason natri phosphat, flometholon, flometholon axetat, loteprednol, loteprednol etabonat, hydrocortison, prednisolon, fludrocortison, triamxinolon, triamxinolon axetonit, betamethason, beclomethason dipropionat, metylprednisolon, flixonolon, flixonolon axetonit, flunisolit, fluocortin-21-butylat, flumethason, flumetason pivalat, budesonit, halobetasol propionat, mometason furoat, fluticason propionat, ciclesonit; hoặc muối được dùng của chúng.

Các tác nhân chống viêm khác hoạt động thông qua các cơ chế chu trình chống viêm còn có thể dùng làm các tác nhân điều trị bệnh bổ sung kết hợp với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) để điều trị các bệnh nhiễm virus ở đường hô hấp. Việc ứng dụng “các chất điều biến tải nạp tín hiệu chống viêm” (trong bản mô tả này được gọi là AISTM), như các chất ức chế phosphodiesteraza (ví dụ, PDE-4, PDE-5, hoặc PDE-7 cụ thể), các chất ức chế yếu tố phiên mã (ví dụ, phong bế NF κ B thông qua ức chế IKK), hoặc chất ức chế kinaza (ví dụ, phong bế P38 MAP, JNK, PI3K, EGFR hoặc Syk) là phương pháp hợp lý để cắt bệnh viêm khi các phân tử này nhỏ hướng đích đến một số lượng có hạn chu trình nội bào - các chu trình truyền tín hiệu mà là các điểm then chốt đối với việc can thiệp để điều trị bệnh kháng viêm (xem tổng quan của P.J. Barnes, 2006). Các tác nhân điều trị bệnh bổ sung không mang tính giới hạn này bao gồm: (2-đimethylamino-etyl)-amit của axit 5-(2,4-điflo-phenoxy)-1-isobutyl-1H-indazol-6-carboxylic (chất ức chế kinaza bản đồ P38, ARRY-797); 3-xyclopropylmethoxy-N-(3,5-điclo-pyridin-4-yl)-4-điflormethoxy-benzamit (chất ức chế PDE-4, Roflumilast); 4-[2-(3-xyclopentylloxy-4-methoxyphenyl)-2-phenyl-etyl]-pyridin (chất ức chế PDE-4, CDP-840); N-(3,5-điclo-4-pyridinyl)-4-(điflormethoxy)-8-[(methylsulfonyl)amino]-1-đibenzofurancarboxamit (chất ức chế PDE-4, Oglemilast); N-(3,5-điclo-pyridin-4-yl)-2-[1-(4-flobenzyl)-5-hydroxy-1H-indol-3-yl]-2-oxo-axetamit (chất ức chế PDE-4, AWD 12-281); (3,5-điclo-1-oxy-pyridin-4-yl)-amit của axit 8-methoxy-2-triflormetyl-quinolin-5-carboxylic (chất ức chế PDE-4, Sch 351591); 4-[5-(4-flophenyl)-2-(4-metansulfinyl-phenyl)-1H-imidazol-4-yl]-pyridin (chất ức chế P38, SB-203850); 4-[4-(4-flo-phenyl)-1-(3-phenyl-propyl)-5-pyridin-4-yl-1H-imidazol-2-yl]-but-3-yn-1-ol (chất ức chế P38, RWJ-67657); 2-đietyl-amino-etyl este của axit 4-xyano-4-(3-xyclopentylloxy-4-methoxy-phenyl)-xyclohexan-carboxylic (tiền dược chất 2-đietyl-etyl este của Cilomilast, chất ức chế PDE-4); (3-clo-4-flophenyl)-[7-methoxy-6-(3-morpholin-4-yl-propoxy)-quinazolin-4-yl]-amin (Gefitinib, chất ức chế EGFR); và 4-(4-metyl-piperazin-1-ylmetyl)-N-[4-metyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamit (Imatinib, chất ức chế EGFR).

Các tổ hợp gồm thuốc giãn phế quản chủ vận thụ thể β 2-adreno được hít vào như formoterol, albuterol hoặc salmeterol với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) cũng là các tổ hợp thích hợp, song không giới hạn ở, hữu ích để điều trị các bệnh nhiễm virus ở đường hô hấp.

Các kết hợp của chất các thuốc giãn phế quản chủ vận thụ thể β_2 -adreno được hít vào như formoterol hoặc salmeterol với các ICS còn được dùng để điều trị cả bệnh co phế quản và bệnh viêm (lần lượt Symbicort® và Advair®). Các kết hợp chứa ICS và các kết hợp chất chủ vận thụ thể β_2 -adreno cùng với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) cũng là thích hợp, song không giới hạn ở, các kết hợp hữu dụng dùng để điều trị các nhiễm virus hô hấp.

Để điều trị hoặc phòng bệnh co thắt phế quản ở phổi, các chất chống tiết axetylcholin có ứng dụng tiềm năng và, do đó, là hữu ích làm các tác nhân điều trị bệnh bổ sung kết hợp với các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) để điều trị các bệnh nhiễm virus ở đường hô hấp. Các chất chống tiết axetylcholin này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đối kháng thụ thể muscarin (đặc biệt là M3 kiểu phụ) mà đã thể hiện hiệu quả điều trị ở người để kiểm soát axetylcholin trong COPD (Witek, 1999); axit 1-{4-hydroxy-1-[3,3,3-tris-(4-flo-phenyl)-propionyl]-pyrrolidin-2-cacbonyl}-pyrrolidin-2-carboxylic (1-metyl-piperidin-4-ylmetyl)-amit; 3-[3-(2-diethylamino-axetoxy)-2-phenyl-propionyloxy]-8-isopropyl-8-metyl-8-azonia-bixyclo[3.2.1]octan (ipratropium-N,N-diethylglyxinat); este 1-aza-bixyclo[2.2.2]oct-3-yl của axit 1-xyclohexyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylic (Solifenacin); 1-aza-bixyclo[2.2.2]oct-3-yl este của axit 2-hydroxymetyl-4-metansulfinyl-2-phenyl-butyric (Revatropate); 2-{1-[2-(2,3-dihydro-benzofuran-5-yl)-etyl]-pyrrolidin-3-yl}-2,2-diphenyl-axetamit (Darifenacin); 4-azepan-1-yl-2,2-diphenyl-butyramit (Buzepide); 7-[3-(2-diethylamino-axetoxy)-2-phenyl-propionyloxy]-9-etyl-9-metyl-3-oxa-9-azonia-trixyclo[3,3,1,02,4]nonan (oxitropium-N,N-diethylglyxinat); 7-[2-(2-diethylamino-axetoxy)-2,2-di-thiophen-2-yl-axetoxy]-9,9-dimetyl-3-oxa-9-azonia-trixyclo[3,3,1,02,4]nonan (tiotropium-N,N-diethylglyxinat); 2-(3-diisopropylamino-1-phenyl-propyl)-4-metyl-phenyl este của axit dimethylamino-axetic (tolterodine-N,N-dimethylglyxinat); 3-[4,4-bis-(4-flo-phenyl)-2-oxo-imidazolidin-1-yl]-1-metyl-1-(2-oxo-2-pyridin-2-yl-etyl)-pyrrolidinium; 1-[1-(3-flo-benzyl)-piperidin-4-yl]-4,4-bis-(4-flo-phenyl)-imidazolidin-2-on; 1-xyclooctyl-3-(3-metoxy-1-aza-bixyclo[2.2.2]oct-3-yl)-1-phenyl-prop-2-yn-1-ol; 3-[2-(2-diethylamino-axetoxy)-2,2-di-thiophen-2-yl-axetoxy]-1-(3-phenoxy-propyl)-1-azonia-bixyclo[2.2.2]octan (aclidinium-N,N-diethylglyxinat); hoặc 1-metyl-1-(2-phenoxy-etyl)-piperidin-4-yl este của axit (2-diethylamino-axetoxy)-di-thiophen-2-yl-axetic.

Các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) còn có thể được kết hợp với các tác nhân tiêu nhầy để điều trị cả bệnh nhiễm và các triệu chứng nhiễm ở đường hô hấp. Ví dụ không mang tính giới hạn về tác nhân tiêu nhầy là ambroxol. Tương tự, các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) có thể được kết hợp với các loại thuốc long đờm để điều trị cả bệnh nhiễm và các triệu chứng nhiễm ở đường hô hấp. Ví dụ không mang tính giới hạn về thuốc long đờm là guaifenesin.

Nước muối ưu trương khí dung được dùng để cải thiện thanh thải ngay lập tức và thanh thải kéo dài ở các đường khí nhỏ ở các bệnh nhân mắc các bệnh phổi (Kuzik, J. Pediatrics 2007, 266). Các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) còn có thể được kết hợp với nước muối ưu trương khí dung cụ thể là khi nhiễm virus Pneumovirinae bị biến chứng với bệnh viêm tiểu phế quản. Kết hợp các hợp chất có công thức (I) hoặc công thức (II) với nước muối ưu trương còn có thể chứa tác nhân bất kỳ trong số các tác nhân bổ sung nêu trên. Theo một phương án, khí dung khoảng 3% nước muối ưu trương được sử dụng.

Hợp chất bất kỳ có khả năng kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung điều trị bệnh ở dạng liều đơn nhất để dùng đồng thời hoặc dùng liên tục cho bệnh nhân. Phép điều trị kết hợp có thể được dùng theo phác đồ đồng thời hoặc liên tục. Khi được dùng liên tục, việc kết hợp có thể được dùng thành hai hoặc nhiều lần dùng.

Việc dùng đồng thời hợp chất theo sáng chế với một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác thường là cách dùng đồng thời hoặc dùng liên tục hợp chất và một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác, sao cho cả hợp chất này và một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác đều có mặt trong cơ thể của bệnh nhân với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh.

Việc dùng đồng thời bao gồm việc dùng liều lượng đơn vị các hợp chất trước hoặc sau khi dùng liều lượng đơn vị một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác, ví dụ, dùng các hợp chất trong khoảng một vài giây, một vài phút, hoặc một vài giờ sau khi dùng một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác. Ví dụ, liều đơn vị của hợp chất có thể được dùng đầu tiên, tiếp theo trong khoảng một vài giây hoặc một vài phút thì dùng liều đơn vị của một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác. Theo cách khác, liều đơn vị của một hoặc nhiều dược chất khác để điều trị bệnh có thể được dùng đầu tiên, tiếp theo dùng liều đơn vị của hợp chất trong khoảng một vài giây hoặc một vài phút. Trong một số trường hợp,

ban đầu có thể mong muốn dùng liều đơn vị của hợp chất, tiếp theo sau khoảng một vài giờ (ví dụ, 1 giờ đến 12 giờ), dùng liều đơn vị của một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác. Trong các trường hợp khác, ban đầu có thể mong muốn dùng liều đơn vị của một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh khác, tiếp theo sau khoảng một vài giờ (ví dụ, 1 giờ đến 12 giờ), dùng liều đơn vị của hợp chất theo sáng chế.

Phép điều trị kết hợp có thể tạo ra “sự hiệp đồng” và “tác dụng hiệp đồng”, tức là tác dụng đạt được khi các hoạt chất được sử dụng cùng nhau là mạnh hơn tổng các tác dụng đạt được khi sử dụng riêng rẽ các hợp chất. Tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi các hoạt chất được: (1) cùng bào chế và được dùng hoặc được phân phối đồng thời trong chế phẩm kết hợp; (2) được phân phối luân phiên hoặc song song ở dạng các chế phẩm riêng rẽ; hoặc (3) theo một số phác đồ khác. Khi được phân phối theo cách điều trị luân phiên, tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi các hợp chất được dùng hoặc được phân phối liên tục, ví dụ ở dạng các viên nén, các viên tròn hoặc các viên nang riêng rẽ, hoặc bằng các lần tiêm khác nhau trong bơm tiêm khác nhau. Nói chung, trong quá trình điều trị luân phiên, liều lượng hữu hiệu của từng hoạt chất được dùng liên tục, tức là theo từng đợt, trong khi theo cách kết hợp điều trị thì liều lượng hữu hiệu của hai hoặc nhiều hoạt chất được dùng cùng với nhau. Tác dụng kháng virus hiệp đồng là tác dụng kháng virus mạnh hơn tác dụng cộng hợp thuần túy theo dự tính của các hợp chất riêng rẽ trong hỗn hợp này.

Theo phương án khác nữa, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae ở người, phương pháp bao gồm việc dùng cho người lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp riêng biệt điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae ở người, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người lượng hữu hiệu về mặt được tính để điều trị bệnh của hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ nêu trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và chất mang được dụng hoặc tá được.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị nhiễm Pneumovirinae ở người bằng cách dùng cho người lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của chất triet quang,

chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang, chất hồ biến, chất đa hình, chất giả đa hình, dạng vô định hình, hydrat hoặc solvat của hợp chất của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng hoặc este của nó.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp riêng biệt điều trị nhiễm Pneumovirinae ở người có nhu cầu điều trị, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của chất triệt quang, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang, chất hồ biến, chất đa hình, chất giả đa hình, dạng vô định hình, hydrat hoặc solvat của hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó.

Theo phương án khác nữa, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người, phương pháp này bao gồm việc dùng cho người lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó.

Theo phương án khác nữa, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người, phương pháp này bao gồm việc dùng cho người lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và ít nhất một dược chất điều trị bệnh bổ sung.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp riêng biệt điều trị bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người có nhu cầu điều trị, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp riêng biệt điều trị bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người có nhu cầu điều trị, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh, và ít nhất một dược chất điều trị bệnh bổ sung.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp riêng biệt điều trị bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người có nhu cầu điều trị, trong đó người này còn đang mắc bệnh viêm tiểu phế quản, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người hợp chất có công thức (I), công thức (II), hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp riêng biệt điều trị bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người có nhu cầu điều trị, trong đó người này còn đang mắc bệnh viêm phổi, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người hợp chất có công thức (I), công thức (II), hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp riêng biệt nhằm cải thiện các triệu chứng hô hấp ở người đang nhiễm virus hợp bào hô hấp, mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho người hợp chất có công thức (I), công thức (II), hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh.

Các triệu chứng hô hấp ở người đang nhiễm virus hợp bào hô hấp có thể bao gồm ngạt mũi hoặc sổ mũi, ho, thở khò khè, hắt hơi, thở gấp hoặc khó thở, ngưng thở, bệnh viêm tiểu phế quản, và bệnh viêm phổi.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, để bào chế thuốc dùng để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae hoặc bệnh nhiễm virus hợp bào hô hấp.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, để bào chế thuốc dùng để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae hoặc nhiễm virus hợp bào hô hấp.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt dược tính của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và chất mang được dụng hoặc tá dược. Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt dược tính của hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví

dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và chất mang được dụng hoặc tá được.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt được tính của hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và chất mang hoặc tá được dụng và lượng hữu hiệu về mặt được tính của ít nhất một được chất điều trị bệnh bổ sung. Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt được tính của hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, và chất mang được dụng hoặc tá được và lượng hữu hiệu về mặt được tính của ít nhất một được chất điều trị bệnh bổ sung.

Sáng chế còn đề xuất các phương án riêng biệt chứa hợp chất có công thức (I), công thức (II), hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, dùng để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae hoặc nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người.

Sáng chế còn đề xuất các phương án riêng biệt chứa hợp chất có công thức (I), công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của chúng, để dùng làm thuốc.

Sáng chế còn đề xuất các phương án riêng biệt là phương pháp để bào chế thuốc nhằm để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae hoặc nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người, khác biệt ở chỗ hợp chất có công thức (I), công thức (II), hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, được sử dụng.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của chúng, dùng để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae hoặc nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người.

Sáng chế còn đề xuất các phương án riêng biệt chứa hợp chất có công thức (II) hoặc một trong số các hợp chất cụ thể theo các ví dụ trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng, solvat, và/hoặc este của nó, dùng để điều trị bệnh nhiễm virus Pneumovirinae hoặc nhiễm virus hợp bào hô hấp ở người.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất như đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề xuất được phẩm như đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng hợp chất có công thức (I), như đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra hợp chất có công thức (I), như đã được bộc lộ trong bản mô tả này.

Các chất chuyển hóa của các hợp chất

Các sản phẩm chuyển hóa in vivo của các hợp chất theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của bản mô tả này, ở mức độ các sản phẩm này là mới và không hiển nhiên so với tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Ví dụ, các sản phẩm này có thể thu được từ việc oxy hóa, khử, thủy phân, amit hóa, este hóa và tương tự đối với hợp chất được dùng, chủ yếu là nhờ các quy trình enzym. Do đó, sáng chế bao hàm các hợp chất mới và không hiển nhiên được tạo ra theo quy trình bao gồm bước cho hợp chất này tiếp xúc với động vật có vú trong một thời gian đủ để sinh ra sản phẩm chuyển hóa của nó. Các sản phẩm này thường được xác định bằng cách điều chế hợp chất đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ (ví dụ, ^{14}C hoặc ^3H), dùng nó ngoài đường tiêu hóa theo liều dò được (ví dụ, hơn 0,5mg/kg) đối với động vật như chuột to, chuột nhắt, chuột lang, khỉ, hoặc đối với người, cho phép đủ thời gian chuyển hóa để xuất hiện (thông thường khoảng 30 giây đến 30 giờ) và phân lập các sản phẩm chuyển đổi của nó từ nước tiểu, máu hoặc các mẫu sinh học khác. Các sản phẩm này được phân lập một cách dễ dàng do chúng được gắn nhãn (các sản phẩm khác được phân lập bằng cách sử dụng các kháng thể có khả năng liên kết với các biểu vị tồn tại trong sản phẩm chuyển hóa). Các cấu trúc chuyển hóa được xác định theo cách thông thường, ví dụ theo phân tích MS hoặc NMR. Nói chung, việc phân tích các chất chuyển hóa được thực hiện theo cùng cách như các nghiên cứu chuyển hóa thuốc thông thường mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ. Các sản phẩm chuyển đổi, chừng nào chúng không được tìm thấy theo cách khác in vivo, có thể được dùng trong các thử nghiệm chẩn đoán để cấp liều điều trị các hợp chất thậm chí nếu chúng không có hoạt tính kháng virus HSV của chính nó.

Cách thức và phương pháp xác định mức độ ổn định của các hợp chất trong các dịch tiết dạ dày-ruột thay thế là đã biết. Các hợp chất được xác định theo là ổn định trong dải dạ dày-ruột non khi ít hơn 50 phần trăm mol của các nhóm đã được bảo vệ được khử

bảo vệ trong dịch ruột thay thế hoặc dịch nước hoa quả sau khi ủ trong thời gian 1 giờ ở 37°C. Đơn giản các hợp chất là ổn định đối với dải dạ dày-ruột non không có nghĩa là chúng không bị thủy phân in vivo. Các tiền dược chất thường là ổn định trong hệ tiêu hóa nhưng có thể bị thủy phân đáng kể thành thuốc gốc trong khoang tiêu hóa, gan, phổi hoặc cơ quan tiêu hóa khác, hoặc trong các tế bào nói chung. Thuật ngữ tiền dược chất được dùng trong bản mô tả này được hiểu là hợp chất được thiết kế về mặt hóa học để giải phóng một cách hiệu quả thuốc gốc sau khi vượt qua các hàng rào sinh học đối với việc phân phối qua đường miệng.

Các chữ viết tắt

Một số chữ viết tắt và chữ rút gọn nhất định được dùng để mô tả các chi tiết của các thử nghiệm. Mặc dù phần lớn các chữ này đều được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, Bảng 1 chứa danh mục gồm nhiều trong số các chữ viết tắt và các chữ rút gọn.

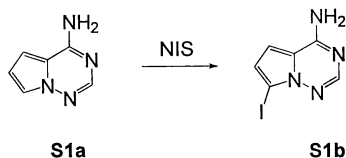
Bảng 1. Danh mục các chữ viết tắt và các chữ rút gọn.

Chữ viết tắt	Nghĩa
Ac	axetat
ACN	axetonitril
AIBN	azobisisobutyronitril
Bn	benzyl
Bu	butyl
Bz	benzoyl
BzCl	benzoyl clorua
CDI	1,1'-cacbonyldiimidazol
DAST	đietylaminosulfua triflorua

DCE	1,2-đicloetan
DCM	điclometan
DMAP	4-đimetylamipyridin
DMDO	dimethyldioxiran
DMSO	dimetylsulfoxit
DMF	đimetylformamit
DMTrCl	4,4'-đimetoxytritylclorua
DMTr	4,4'-đimetoxytrityl
EDCI	N-(3-đimetylaminopropyl)-N'-etylcarbodiimit hydroclorua
Et	etyl
Imid	imidazol
KOtBu	kali Tert-butoxit
LC	sắc ký lỏng
MCPBA	axit meta-cloperbenzoic
Me	metyl
m/z	tỷ lệ khối lượng so với điện tích
MS hoặc ms	phổ khối
NIS	N-iodosuccinimit
NMP	N-metyl-2-pyrolidon
Ph	phenyl
Ph ₃ P	triphenylphosphin

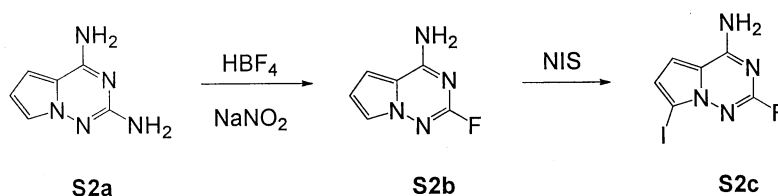
PMB	para-metoxylbenzyl
PMBCl	para-metoxylbenzyl clorua
PhOC(S)Cl	phenylclothionoformat
(PhO) ₃ PMeI	metyltriphenoxylphosphoni iotua
Pyr	pyridin
RT	nhiệt độ trong phòng
TBAF	tetrabutylamoni florua
TBS	tert-butylđimetylsilyl
TBSCl	tert-butylđimetylsilyl clorua
TMSN ₃	trimetylsilyl azit
TEA	trietylamin
TES	triethysilan
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
TMS	trimetylsilyl
TMSCl	trimetylsilyl clorua
Ts	4-toluensulfonyl
TsOH	axit tosylic
δ	phần triệu tham chiếu đến pic dung môi không được đơteri hóa còn lại

Sơ đồ chung



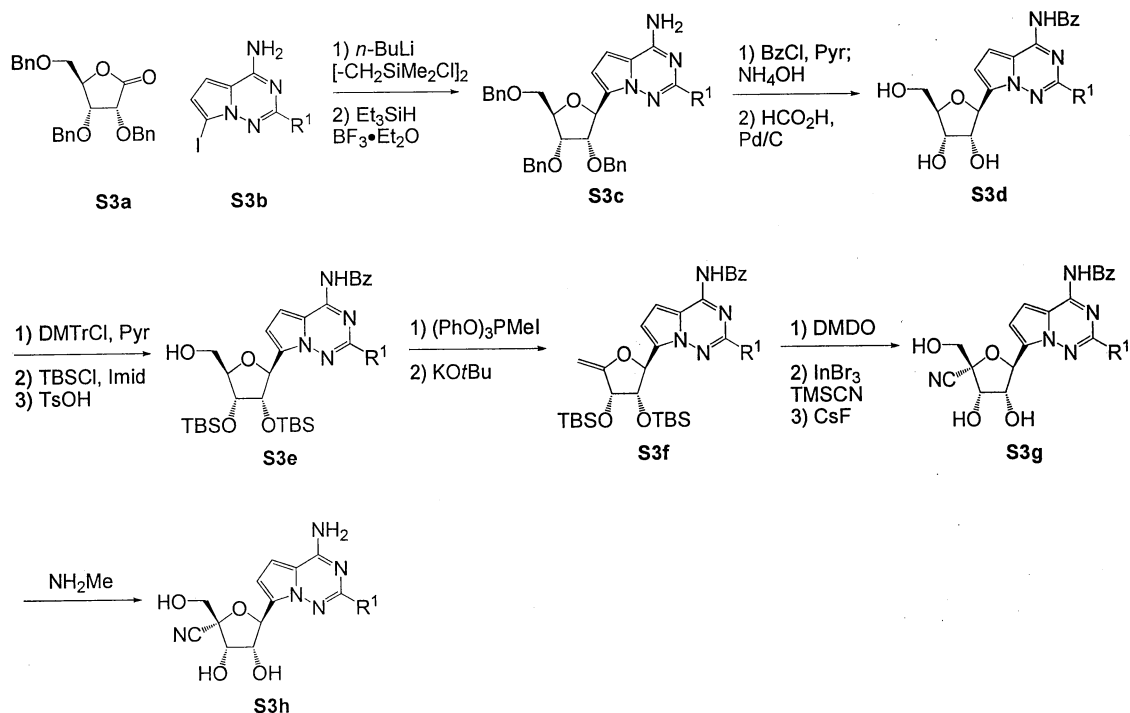
Sơ đồ 1.

Sơ đồ 1 thể hiện quy trình tổng hợp chung các chất trung gian bắt đầu bằng phản ứng iot hóa (ví dụ, NIS) để tạo ra bazơ của nucleotit có công thức S1b.



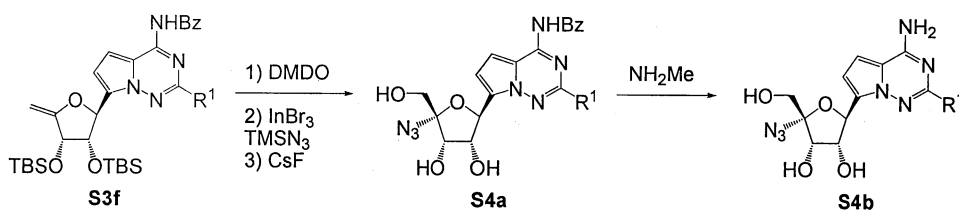
Sơ đồ 2.

Sơ đồ 2 thể hiện quy trình tổng hợp chung các chất trung gian bắt đầu bằng phản ứng flo hóa (ví dụ, HBF_4 , NaNO_2) theo cách tương tự cách đã được bộc lộ trong WO2012037038A1 để tạo ra chất trung gian có công thức S2b. Sau đó, chất trung gian có công thức S2b có thể được iot hóa (ví dụ, NIS) để tạo ra nucleobazơ có công thức S2c.



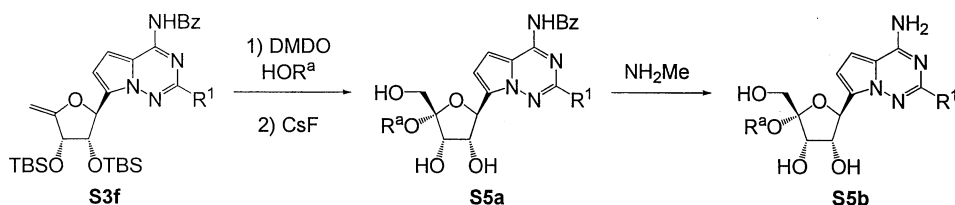
Sơ đồ 3.

Sơ đồ 3 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng phản ứng trao đổi lithi-halogen (ví dụ, $n\text{-BuLi}$, $[-\text{CH}_2\text{SiMe}_2\text{Cl}]_2$) với nucleobazơ thích hợp có công thức S3b, tiếp theo bổ sung vào lacton có công thức S3a. Việc khử nhóm hydroxyl 1' nhánh trong các điều kiện axit Lewis (ví dụ, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, Et_3SiH) tạo ra chất trung gian có công thức S3c. Trước hết, chất trung gian có công thức S3c có thể được bảo vệ (ví dụ, BzCl , Pyr ; NH_4OH) ở chức nitor, và sau đó các nhóm benzyl có thể được loại ra ở các điều kiện khử (ví dụ, HCO_2H , Pd/C , BCl_3 , BBr_3) để tạo ra chất trung gian có công thức S3d. Trình tự bao gồm việc bảo vệ hydroxyl 5' chọn lọc (ví dụ, DMTrCl), sau đó bảo vệ hydroxyl 2' và 3' (ví dụ, TBSCl), tiếp theo loại bỏ chọn lọc nhóm bảo vệ hydroxyl 5' trong các điều kiện axit (ví dụ, TsOH) tạo ra chất trung gian có công thức S3e. Sau đó, nhóm hydroxyl 5' có thể được chuyển hóa thành iodua tương ứng (ví dụ, $(\text{PhO})_3\text{PMel}$), mà tiếp đó được cho tiếp xúc với các điều kiện kiềm (tức là KOtBu) để thực hiện phản ứng loại trừ tạo ra chất trung gian có công thức S3f. Việc oxy hóa olefin có công thức S3f (ví dụ, DMDO), tiếp theo là xử lý bằng ái nhân thích hợp (ví dụ, TMSCN) trong các điều kiện axit Lewis (ví dụ, InBr_3) và việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, CsF) tạo ra chất trung gian có công thức S3g. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ nitor (ví dụ, NH_2Me) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S3h.



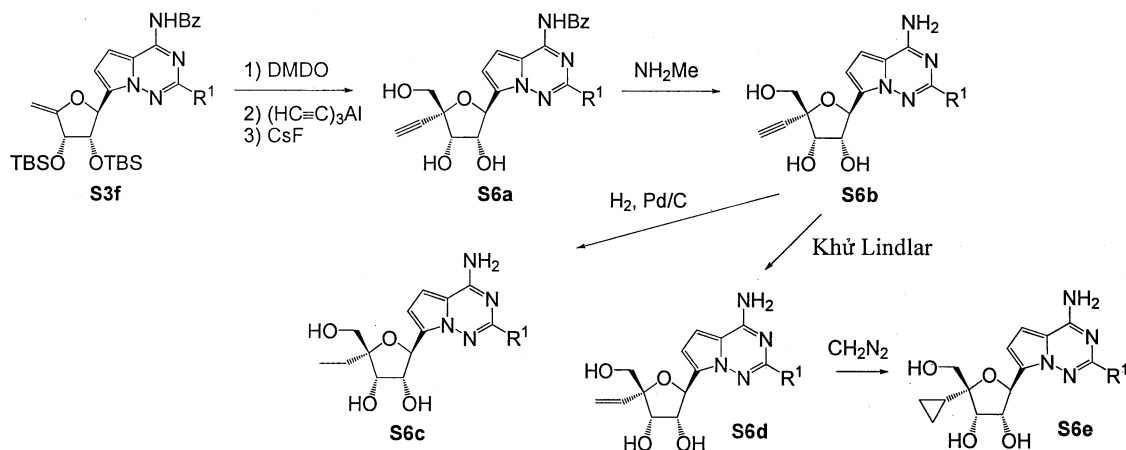
Sơ đồ 4.

Sơ đồ 4 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc oxy hóa olefin có công thức S3f (ví dụ, DMDO), tiếp theo là xử lý bằng ái nhân thích hợp (ví dụ, TMSN_3) trong các điều kiện axit Lewis (ví dụ, InBr_3) theo cách tương tự mà đã được bộc lộ trong tài liệu: *J. Med. Chem.*, 2007, 50, 5463-5470. Khi đó, việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, CsF) tạo ra chất trung gian có công thức S4a. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ nitor (ví dụ, NH_2Me) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S4b.



Sơ đồ 5.

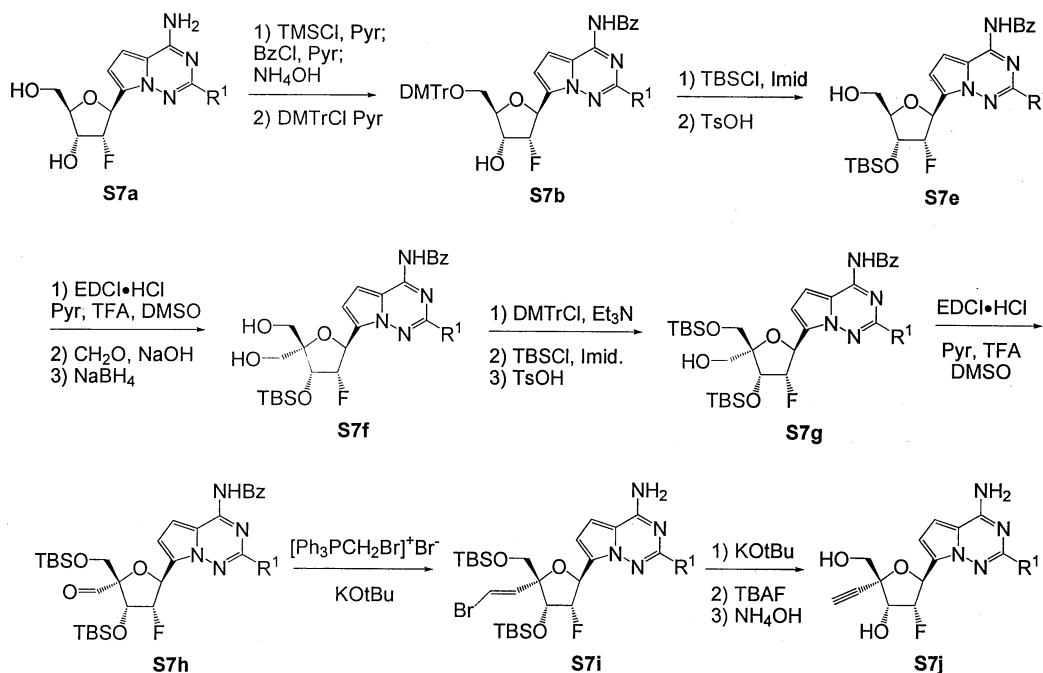
Sơ đồ 5 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc oxy hóa olefin có công thức S3f (ví dụ, DMDO) với sự có mặt của rượu thích hợp HOR^a, tiếp theo là loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, CsF) để tạo ra chất trung gian có công thức S5a. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH₂Me) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S5b.



Sơ đồ 6.

Sơ đồ 6 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc oxy hóa olefin có công thức S3f (ví dụ, DMDO), tiếp theo là xử lý bằng ái nhân thích hợp (ví dụ, (HC≡C)₃Al) theo cách tương tự mà đã được bộc lộ trong tài liệu: Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 2005, 24, 343-347. Việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, CsF) khi đó tạo ra chất trung gian có công thức S6a. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH₂Me) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S6b. Việc xử lý hợp chất cuối cùng thông qua các điều kiện hydro hóa (ví dụ, H₂, Pd/C hoặc các điều kiện Lindlar) có thể lần lượt tạo ra một cách chọn lọc các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S6c và S6d. Việc xử lý hợp chất cuối cùng có công thức S6d

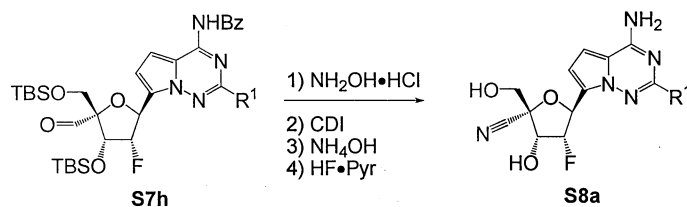
thông qua các điều kiện xyclopropan hóa (ví dụ, CH_2N_2) có thể tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S6e.



Sơ đồ 7.

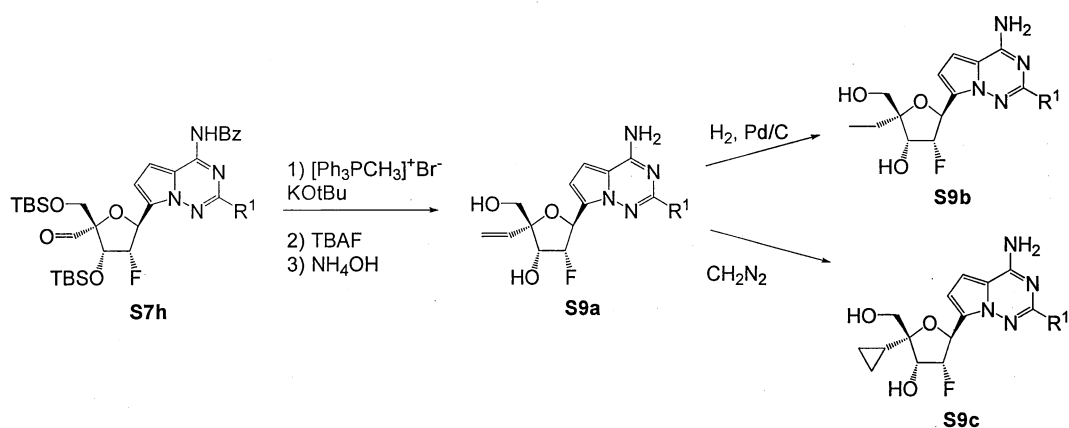
Sơ đồ 7 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng trình tự tổng hợp để bảo vệ nitơ (ví dụ, TMSCl , Pyr; BzCl , Pyr; NH_4OH) của chất trung gian có công thức S7a, tổng hợp được theo cách tương tự đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2012037038A1. Việc bảo vệ một cách chọn lọc nhóm hydroxyl 5' (ví dụ, DMTrCl), sau đó tạo ra chất trung gian có công thức S7b. Việc bảo vệ nhóm hydroxyl 2' (ví dụ, TBSCl), tiếp theo là loại bỏ nhóm hydroxyl 5' trong các điều kiện axit (ví dụ, TsOH) tạo ra chất trung gian có công thức S7e. Việc chuyển hóa nhóm hydroxyl 5' thành aldehyt trong các điều kiện oxy hóa (ví dụ, $\text{EDCI} \cdot \text{HCl}$, Pyr, TFA, DMSO), tiếp theo là ngưng tụ enolat tương ứng với formaldehyt và khử (ví dụ, NaBH_4) tạo ra chất trung gian có công thức S7f. Việc bảo vệ chọn lọc một cách liên tục các gốc hydroxyl bằng các nhóm bảo vệ trực giao (ví dụ, DMTrCl và TBSCl), tiếp theo là loại bỏ nhóm bảo vệ kém bền hơn trong các điều kiện axit (ví dụ, TsOH), sau đó tạo ra chất trung gian có công thức S7g. Việc chuyển đổi nhóm hydroxyl thành aldehyt trong các điều kiện oxy hóa (ví dụ, $\text{EDCI} \cdot \text{HCl}$, Pyr, TFA, DMSO) tạo ra chất trung gian có công thức S7h. Việc xử lý aldehyt có công thức S7h thành chất trung gian halo-olefin có công thức S7i có thể được thực hiện ở các

điều kiện olefin hóa Wittig (ví dụ, $[\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}]^+\text{Br}^-$, KOtBu). Phản ứng loại trừ trong các điều kiện kiềm (ví dụ, KOtBu) tạo ra alkyn, và việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, TBAF) và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S7j.



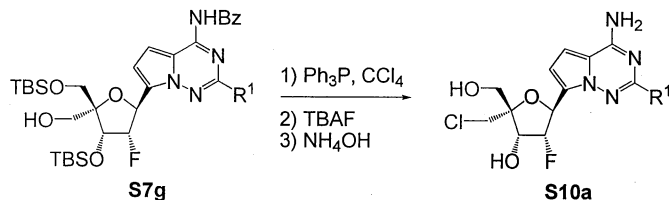
Sơ đồ 8.

Sơ đồ 8 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc tạo ra oxim (ví dụ, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), tiếp theo chuyển hóa oxim thành nhóm nitril (ví dụ, CDI). Việc loại bỏ nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH), và các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, $\text{HF}\cdot\text{Pyr}$), sau đó tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S8a.



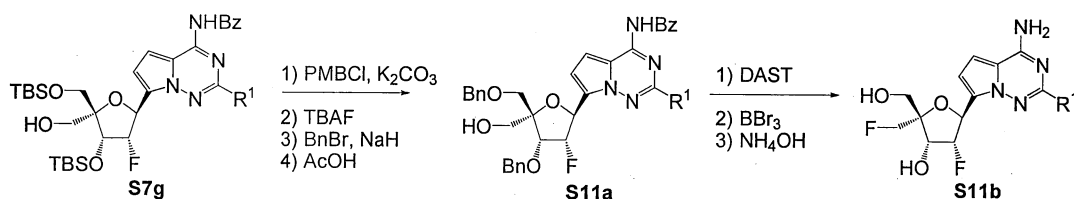
Sơ đồ 9.

Sơ đồ 9 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc xử lý aldehyt có công thức S7h thành olefin nhờ các điều kiện olefin hóa Wittig (ví dụ, $[\text{Ph}_3\text{PCH}_3]^+\text{Br}^-$, KOtBu). Việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, TBAF), và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S9a. Các điều kiện khử (ví dụ, H_2 , Pd/C) khi đó có thể sinh ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S9b, và các điều kiện xyclopropan hóa (ví dụ, CH_2N_2) có thể sinh ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S9c.



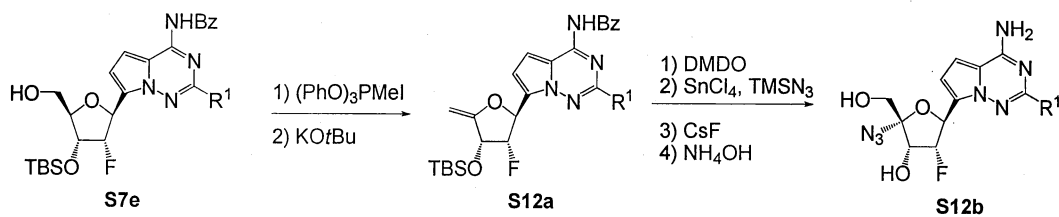
Sơ đồ 10.

Sơ đồ 10 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng phản ứng Appel (ví dụ, Ph_3P , CCl_4) chuyển hóa nhóm hydroxyl thành clorua. Việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, TBAF), và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S10a.



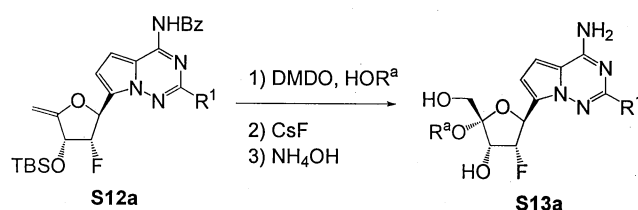
Sơ đồ 11.

Sơ đồ 11 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc bảo vệ nhóm hydroxyl tự do của chất trung gian có công thức S7g bằng nhóm bảo vệ không bền (ví dụ, PMBCl, K_2CO_3). Loại bỏ chọn lọc các nhóm bảo vệ silyloxy 2' và 5' (ví dụ, TBAF), tiếp theo tái bảo vệ bằng các nhóm bảo vệ mạnh (ví dụ, BnBr, NaH), và việc loại bỏ nhóm bảo vệ hydroxyl không bền trong các điều kiện axit (ví dụ, AcOH) tạo ra chất trung gian có công thức S11a. Việc chuyển đổi nhóm hydroxyl thành flo (ví dụ, DAST), tiếp theo là loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, BBr_3), và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S11b.



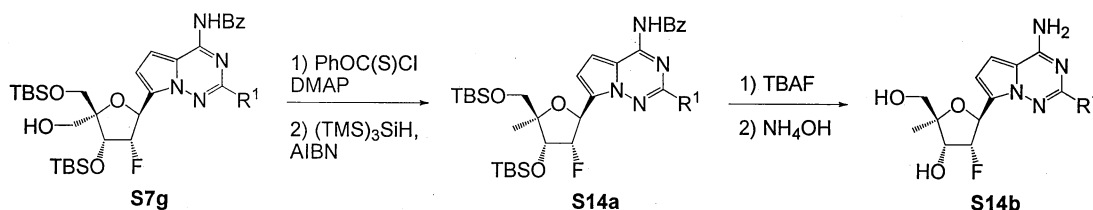
Sơ đồ 12.

Sơ đồ 12 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc chuyển hóa nhóm hydroxyl 5' thành iodua tương ứng (ví dụ, $(\text{PhO})_3\text{PMel}$), mà sau đó được xử lý nhờ các điều kiện kiềm (tức là KOtBu) để thực hiện phản ứng loại trừ sinh ra chất trung gian có công thức S12a. Việc oxy hóa olefin có công thức S12a (ví dụ, DMDO), tiếp theo là xử lý bằng ái nhân thích hợp (ví dụ, TMSN_3) trong các điều kiện axit Lewis (ví dụ, SnCl_4) theo cách tương tự mà đã được bộc lộ trong *J. Med. Chem.*, 2007, 50, 5463-5470, và việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, CsF) và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S12b.



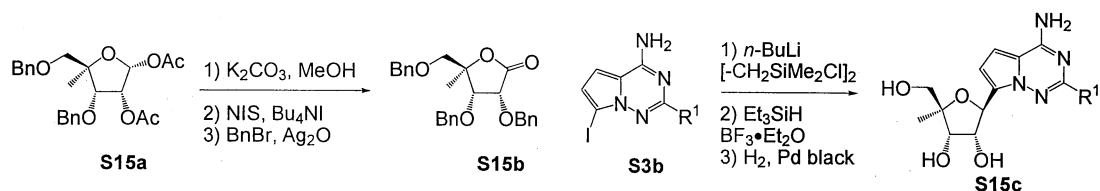
Sơ đồ 13.

Sơ đồ 13 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc oxy hóa olefin có công thức S12a (ví dụ, DMDO) với sự có mặt của rượu thích hợp HOR^a và loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, CsF). Việc loại bỏ nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_2Me) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S13a.



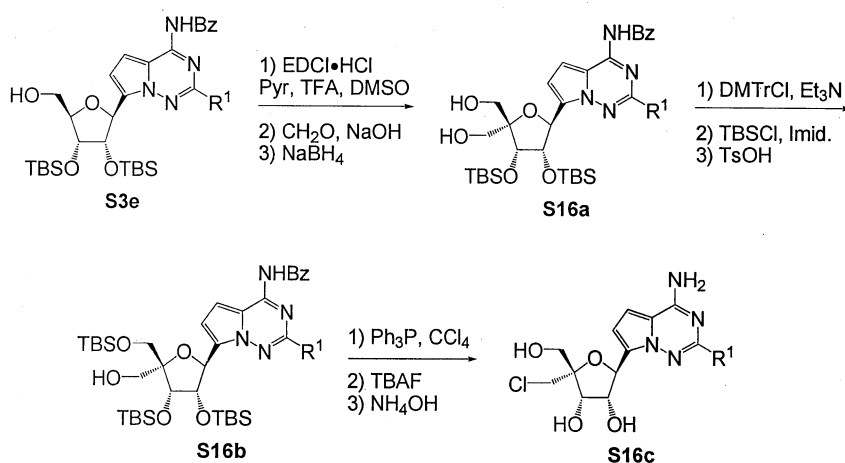
Sơ đồ 14.

Sơ đồ 14 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc tạo ra xantat (ví dụ, PhOC(S)Cl , DMAP), tiếp theo là phản ứng khử oxy hóa Barton–McCombie (ví dụ, $(\text{TMS})_3\text{SiH}$, AIBN) để tạo ra chất trung gian có công thức S14a. Việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, TBAF), và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S14b.



Sơ đồ 15.

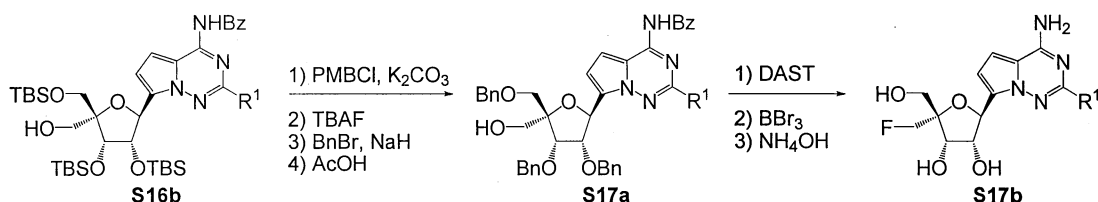
Sơ đồ 15 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng chất trung gian có công thức **S15a** điều chế được theo cách tương tự cách đã được bộc lộ trong tài liệu: Biosci. Biotech. Biochem. 1993, 57, 1433-1438. Việc loại bỏ các nhóm bảo vệ axetat bằng các điều kiện thủy phân (ví dụ, K_2CO_3 , MeOH), tiếp theo các điều kiện oxy hóa chọn lọc về mặt hóa học (ví dụ, NIS, Bu_4NI), và việc bảo vệ nhóm hydroxyl 2' (ví dụ, BnBr, Ag_2O) tạo ra chất trung gian có công thức **S15b**. Việc trao đổi lithi-halogen (ví dụ, $n-BuLi$, $[-CH_2SiMe_2Cl]_2$) với nucleobazơ thích hợp có công thức **S3b** và bổ sung vào lacton có công thức **S15b**, tiếp theo khử nhóm hydroxyl 1' trong các điều kiện axit Lewis (ví dụ, $BF_3 \cdot Et_2O$, Et_3SiH), và khử bảo vệ (ví dụ, H_2 , Pd đen) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức **S15c**.



Sơ đồ 16.

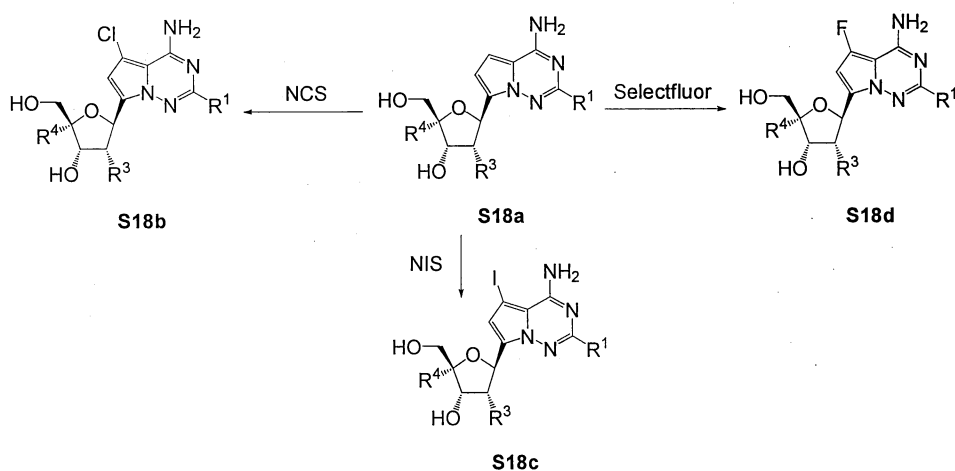
Sơ đồ 16 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc chuyển hóa nhóm hydroxyl 5' thành aldehyt trong các điều kiện oxy hóa (ví dụ, EDCI·HCl, Pyr, TFA, DMSO), tiếp theo là ngưng tụ enolat tương ứng với formaldehyt và khử (ví dụ, $NaBH_4$) để tạo ra chất trung gian có công thức **S16a**. Việc bảo vệ chọn lọc một cách liên tục các gốc hydroxyl bằng các nhóm bảo vệ trực giao (ví dụ, DMTrCl và TBSCl), tiếp

theo là loại bỏ nhóm bảo vệ không bền hơn trong các điều kiện axit (ví dụ, TsOH) khi đó tạo ra chất trung gian có công thức S16b. Sau đó, phản ứng Appel (ví dụ, Ph_3P , CCl_4) có thể chuyển hóa nhóm hydroxyl thành clorua, và việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, TBAF), và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S16c.



Sơ đồ 17.

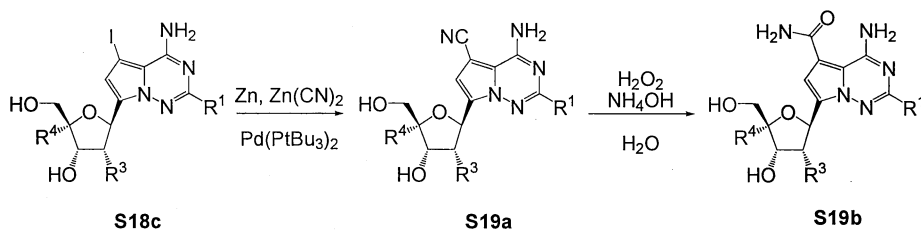
Sơ đồ 17 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng việc bảo vệ nhóm hydroxyl tự do bao gồm chất trung gian S16b với nhóm bảo vệ kém bền (ví dụ, PMBCl, K_2CO_3). Việc loại bỏ chọn lọc các nhóm bảo vệ silyloxy 2', 3', và 5' (ví dụ, TBAF), tiếp theo là tái bảo vệ bằng các nhóm bảo vệ mạnh (ví dụ, BnBr, NaH), và loại bỏ nhóm bảo vệ hydroxyl không bền trong các điều kiện axit (ví dụ, AcOH) tạo ra chất trung gian có công thức S17a. Việc chuyển đổi nhóm hydroxyl thành flo (ví dụ, DAST), tiếp theo là việc loại bỏ các nhóm bảo vệ hydroxyl (ví dụ, BBr_3), và nhóm bảo vệ nitơ (ví dụ, NH_4OH) tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S17b.



Sơ đồ 18.

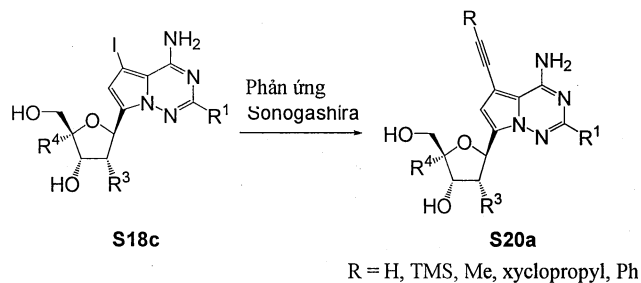
Sơ đồ 18 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất thông qua các phản ứng halogen hóa có ái lực với điện tử thích hợp của chất trung gian có công thức S18a để tạo

ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S18b (ví dụ, NCS), S18c (ví dụ, NIS), và S18d (ví dụ, Selectfluor).



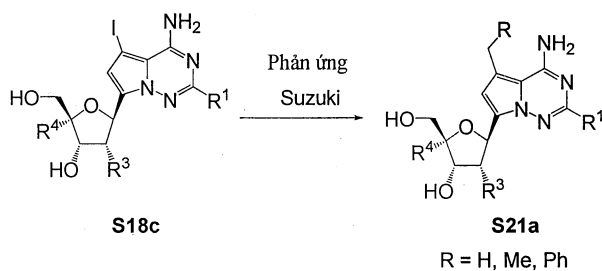
Sơ đồ 19.

Sơ đồ 19 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng phản ứng ngẫu hợp chéo (ví dụ, Zn(CN)_2 , Pd(PtBu)_3) để tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S19a. Sau đó, hợp chất có công thức S19a có thể được xử lý thông qua phản ứng thủy phân nitril (ví dụ, H_2O_2 , NH_4OH , H_2O) để tạo ra các hợp chất thuộc loại có công thức S19b.



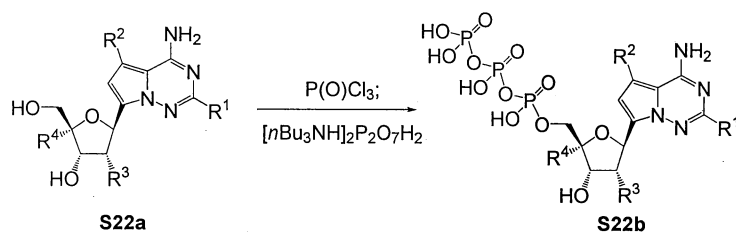
Sơ đồ 20.

Sơ đồ 20 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu theo phản ứng Sonogashira (ví dụ, CuI , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) để tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S20a.



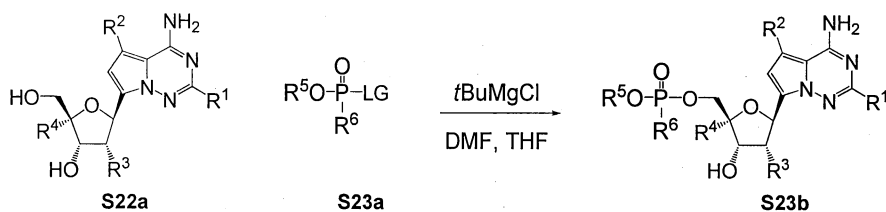
Sơ đồ 21.

Sơ đồ 21 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất bắt đầu bằng phản ứng ngẫu hợp chéo (ví dụ, Pd(dppf)Cl_2 , Cs_2CO_3) để tạo ra các hợp chất cuối cùng thuộc loại có công thức S21a.



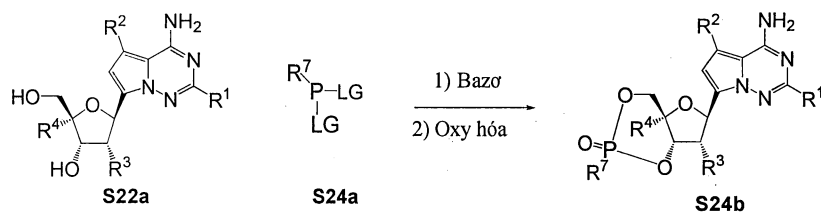
Sơ đồ 22.

Sơ đồ 22 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất liên quan đến việc tổng hợp các chất tương tự được phosphoryl hóa thuộc loại có công thức S22b.



Sơ đồ 23.

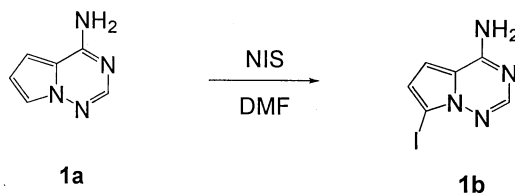
Sơ đồ 23 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất liên quan đến việc tổng hợp các chất tương tự đã được phosphoryl hóa thuộc loại có công thức S23b.



Sơ đồ 24.

Sơ đồ 24 thể hiện quy trình tổng hợp chung các hợp chất liên quan đến việc tổng hợp các chất tương tự đã được phosphoryl hóa thuộc loại có công thức S24b.

Thí nghiệm



Chất trung gian 1b.

N-iodosuccinimit (84mg, 373mmol) ở dạng rắn ở nhiệt độ trong phòng được nạp vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1a (50mg, 373mmol) trong DMF (1ml). Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng dung dịch NaOH 1M (10ml), và huyền phù đặc tạo thành được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau thời gian 1 giờ, các chất rắn được gom bằng cách lọc chân không và làm khô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất trung gian có công thức 1b.

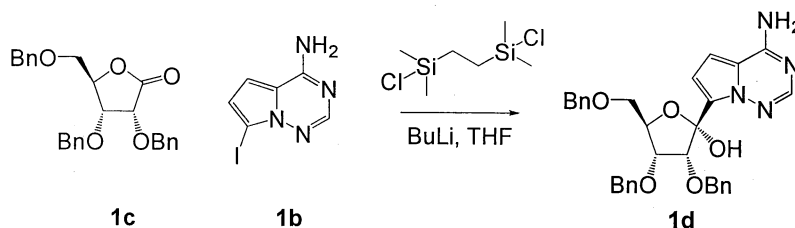
^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 7,89 (s, 1H), 7,78 (br-s, 1H), 6,98 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,82 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 3,30 (br-s, 1H).

LC/MS: $t_R = 1,21$ phút, MS $m/z = 261,02$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_r = 1,536$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Chất trung gian 1d - (2S,3R,4R,5R)-2-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)tetrahydrofuran-2-ol.

n-butyllithi (2,5M trong hexan, 34,4ml, 86,0mmol) được bổ sung nhanh vào huyền phù chứa 7-iodopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amin có công thức 1b (6,84g, 26,3mmol) và 1,2-bis(dimethylsilyl)etan (5,66g, 26,3mmol) trong THF (200ml) ở -78°C trong khí quyển argon. Trong thời gian bổ sung, nhiệt độ bên trong của hỗn hợp phản ứng tăng đến $-40,5^{\circ}\text{C}$, và hỗn hợp phản ứng trở thành dung dịch màu nâu trong. Sau 15 phút, dung dịch chứa (3R,4R,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)đihydrofuran-2(3H)-on (có công thức 1c, mua được từ Carbosynth, 10g, 23,9mmol) trong tetrahydrofuran (40ml) đã được làm lạnh trước đến -78°C , được bổ sung nhanh vào qua ống thông. Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng axit axetic (15ml), và hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được pha loãng bằng etyl axetat (800ml) và rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (500ml) và nước muối (500ml). Lóp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2 (220g SiO_2 cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1d.

LC/MS: $t_R = 1,50$ phút, MS $m/z = 553,34$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

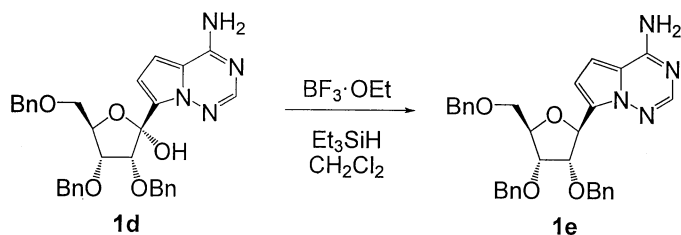
Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN.

HPLC: $t_r = 3,442$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA;

Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: Etyl axetat, $R_f = 0,5$ (UV)



Chất trung gian 1e - 7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amin.

Bo triflorua dietyl eterat (1,59ml, 12,9mmol) được bổ sung từ từ qua xi lanh ở 0°C trong khí quyển argon vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1d (4,74g, 8,58mmol) và trietylsilan (3,56ml, 22,3mmol), trong DCM (43ml). Sau 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được pha loãng từ từ bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (100ml), và hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat (2 x 150ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2 (24g SiO_2 cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1e.

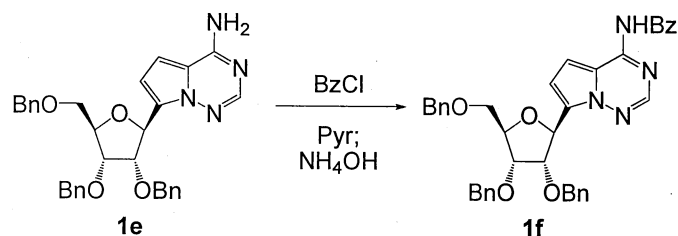
^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,88 (s, 1H), 7,37 – 7,22 (m, 15H), 6,73 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,71 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,66 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,60 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), 4,54 (s, 2H), 4,45 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 4,39 (dt, $J = 7,1, 3,6$ Hz, 1H), 4,25 (t, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,14 – 4,10 (m, 1H), 3,78 (dd, $J = 10,7, 3,4$ Hz, 1H), 3,65 (dd, $J = 10,7, 4,0$ Hz, 1H).

LC/MS: $t_R = 2,01$ phút, MS $m/z = 537,41$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 3,596$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: Etyl axetat, $R_f = 0,3$ (UV)



Chất trung gian 1f - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymetyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamid.

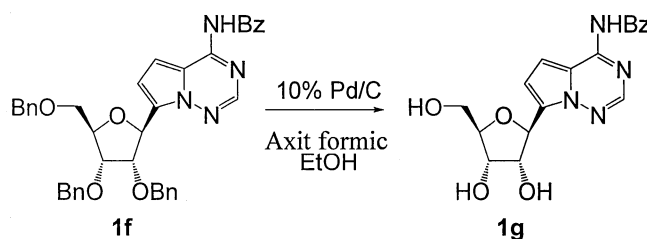
Benzoyl clorua (1,69ml, 14,68mmol) được bổ sung từ từ vào vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1e (3,94g, 7,34mmol) trong pyridin (36,7ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon. Sau thời gian 1 giờ, thêm benzoyl clorua (1,69ml, 14,68mmol) được bổ sung từ từ vào vào. Sau 19 giờ, nước (20ml) được bổ sung từ từ vào và hỗn hợp phản ứng hơi đục. Sau đó, amoni hydroxit (~10ml) được bổ sung vào từ từ cho đến khi hỗn hợp phản ứng thành bazơ ở độ pH=10. Sau thời gian 1 giờ, nước (150ml) được bổ sung nhỏ giọt vào qua phễu cấp liệu và chất rắn màu trắng từ từ kết tủa ra khỏi hỗn hợp phản ứng trong thời gian bổ sung. Hỗn hợp thu được được khuấy trong thời gian 24 giờ và các chất rắn màu trắng được gom bằng cách lọc chân không và sấy khô đồng sôi ra khỏi toluen để tạo ra chất trung gian có công thức 1f.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,23 (br s, 1H), 7,62 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,38 – 7,21 (m, 18H), 7,17 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 5,69 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,63 – 4,44 (m, 4H), 4,43 – 4,39 (m, 1H), 4,22 (t, $J = 4,5$ Hz, 1H), 4,15 – 4,10 (m, 1H), 3,79 (dd, $J = 10,8, 3,2$ Hz, 1H), 3,65 (dd, $J = 10,7, 3,7$ Hz, 1H).

LC/MS: $t_R = 1,91$ phút, MS $m/z = 641,18$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

TLC: chất rửa giải: 50% etyl axetat trong hexan, R_f = 0,6 (UV)



Chất trung gian 1g - N-(7-((2S,3R,4S,5R)-3,4-đihydroxy-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Etanol (68,5ml) và axit formic (51,7ml, 1,37mol) được bổ sung liên tục vào hỗn hợp gồm chất trung gian có công thức 1f (4,39g, 6,85mmol) và paladi trên cacbon (10% trọng lượng, 2,2g) ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon. Sau 3 ngày, hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit, và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được cho đồng sôi với toluen (3 x 20ml) để tạo ra chất trung gian có công thức 1g, mà được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

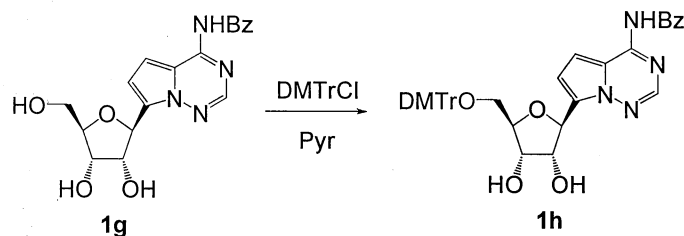
^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8,15 (s, 1H), 7,67 – 7,40 (m, 5H), 7,23 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 5,40 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 4,44 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,17 (t, J = 5,1 Hz, 1H), 4,03 (q, J = 4,3 Hz, 1H), 3,81 (dd, J = 12,1, 3,5 Hz, 1H), 3,71 (dd, J = 12,0, 4,5 Hz, 1H).

LC/MS: t_R = 1,04 phút, MS m/z = 371,15 $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút. ;

HPLC: $t_R = 2,055$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Chất trung gian 1h - N-(7-((2S,3R,4S,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

4,4'-dimethoxytrityl clorua (2,23g, 6,59mmol) được bổ sung ở dạng rắn một lần vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1g (2,44g, 6,59mmol) trong pyridin (32,5ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 5,5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng etyl axetat (300ml) và hỗn hợp thu được được rửa bằng nước muối (3 x 200ml). Lốp hữu cơ được cô trong điều kiện áp suất giảm, và cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (80g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1h.

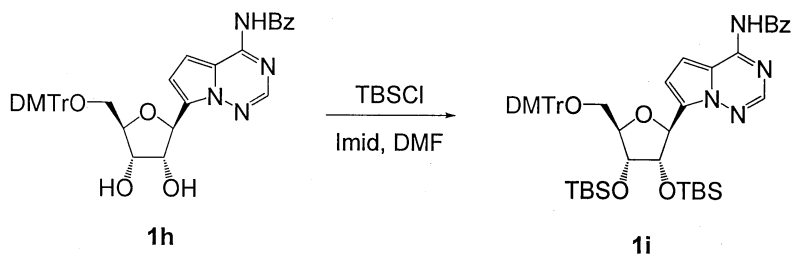
LC/MS: $t_R = 1,68$ phút, MS $m/z = 673,22$ [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6 m;

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 4,270$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 50% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,15$ (UV)



Chất trung gian 1i - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-5-((bis(4-metoxypheyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3,4-bis(Tert-butylđimetylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamid.

Tert-butylđimetylsilyl clorua (2,47g, 16,4mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1h (1,84g, 2,74mmol) và imidazol (2,23g, 32,8mmol) trong N,N-đimetylformamid (28,2ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 17 giờ, dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (500ml) được bổ sung từ từ vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat (500ml), và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (2 x 400ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2 (80g SiO_2 cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1i.

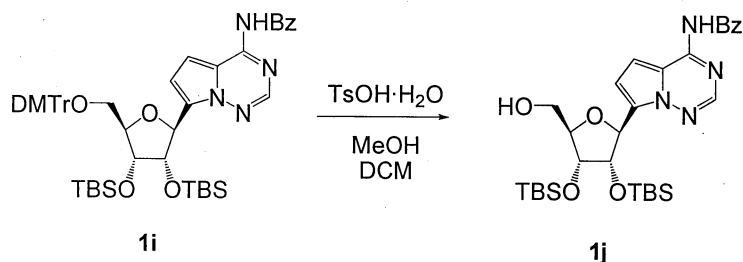
LC/MS: $t_R = 3,43$ phút, MS $m/z = 901,37$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,55 phút 100% ACN, 3,55 phút đến 4,2 phút 100% đến 2% ACN ở 2 μ l/phút

HPLC: $t_R = 5,724$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 50% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,75$ (UV)



Chất trung gian 1j - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-3,4-bis(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Dung dịch chứa monohydrat của axit p-toluensulfonic (509mg, 2,67mmol) trong metanol (3,7ml) được bổ sung từ từ vào vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1i (2,41g, 2,67mmol) trong điclorometan (22,3ml) ở 0°C. Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng dung dịch bicarbonat trong nước bão hòa (100ml), và hỗn hợp thu được được chiết bằng điclorometan (2 x 100ml). Các chiết phẩm hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (120g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1j.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,72 (br-s, 1H), 8,16 (br-t, J = 7,1 Hz, 2H), 8,07 (br-t, J = 7,7 Hz, 3H), 7,49 – 7,43 (m, 1H), 5,75 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,28 (dd, J = 8,1, 4,7 Hz, 1H), 4,81 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,70 – 4,63 (m, 1H), 4,44 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 4,24 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,30 (s, 9H), 0,65 (s, 3H), 0,64 (s, 3H), 0,41 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

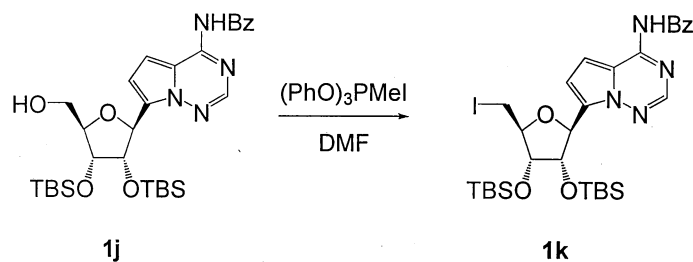
LC/MS: t_R = 2,66 phút, MS m/z = 599,19 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2μl/phút.

HPLC: t_R = 5,622 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 50% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,55$ (UV)



Chất trung gian 1k - N-(7-((2S,3S,4R,5S)-3,4-bis(Tert-butylđimetylsilyloxy)-5-(iodometyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Chất trung gian có công thức 1j (1,19g, 1,99mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa metyltriphenoxyphosphoni iốtua (0,99g, 2,19mmol) trong DMF (9,9ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 giờ, thêm phần metyltriphenoxyphosphoni iốtua (0,99g, 2,19mmol) được bổ sung vào. Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng etyl axetat (200ml) và rửa bằng nước muối (3 x 100ml). Lóp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2 (80g SiO_2 cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1k.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,21 (br s, 1H), 7,61 (br t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,53 (br t, $J = 7,5$ Hz, 3H), 7,05 (br s, 1H), 5,44 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 4,52 (t, $J = 4,3$ Hz, 1H), 4,08 – 3,99 (m, 2H), 3,55 (dd, $J = 10,7, 5,2$ Hz, 1H), 3,38 (dd, $J = 10,7, 5,0$ Hz, 1H), 0,93 (s, 9H), 0,85 (s, 9H), 0,16 (s, 3H), 0,11 (s, 3H), -0,01 (s, 3H), -0,11 (s, 1H).

LC/MS: $t_R = 3,06$ phút, MS $m/z = 709,16$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

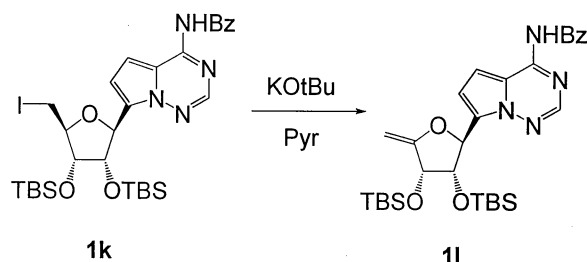
Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 5,837$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA;

Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 20% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,45$ (UV)



Chất trung gian 1l - N-(7-((2S,3S,4S)-3,4-bis(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-metylen-tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Kali t-butoxit (700mg, 6,24mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1k (1,77g, 2,5mmol) trong pyridin (25ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 2 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (25ml) và nước muối (200ml). Hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat (300ml). Sau đó, lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (200ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2 (40g SiO_2 cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 1l.

LC/MS: $t_R = 2,87$ phút, MS $m/z = 581,37$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

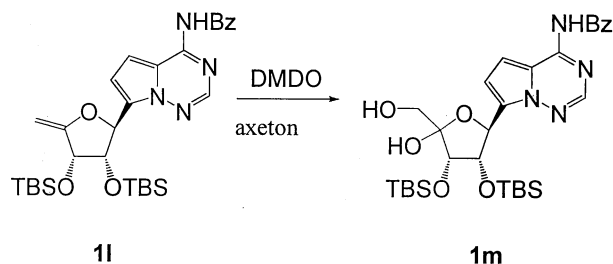
Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic

Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 5,750$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 50% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,20$ (UV)



Chất trung gian 1m - N-(7-((2S,3S,4S)-3,4-bis(tert-butylđimethylsilyloxy)-5-hydroxy-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamid.

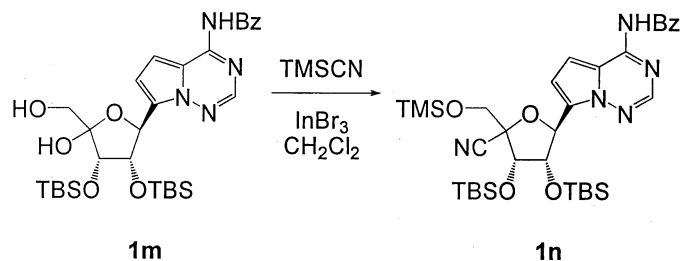
DMSO (dung dịch 0,07M trong axeton, 13,8ml, 0,964mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 1l (560mg, 0,964mmol) trong axeton (4,82ml) ở 0°C. Sau thời gian 10 phút, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm được làm khô đồng sôi với toluen (2 x 1ml) để tạo ra có công thức 1m mà được sử dụng ngay lập tức ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

LC/MS: $t_R = 2,57$ phút, MS $m/z = 615,14$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic

Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.



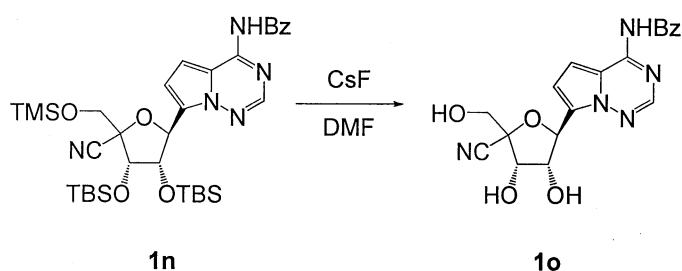
Chất trung gian 1n - N-(7-((2S,3S,4S)-3,4-bis(tert-butylđimethylsilyloxy)-5-xyano-5-((trimethylsilyloxy)metyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamid.

Indium (III) bromua (681mg, 1,92mmol) ở 0°C trong khí quyển argon được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian thô có công thức 1m (~592mg, ~0,964mmol) và trimethylsilyl xyanua (640µl, 4,80mmol) trong điclorometan (19,2ml). Sau 4,5 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (6ml) và để ấm đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được phân bố giữa điclorometan (20ml) và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (20ml). Các pha được tách và lớp nước được chiết bằng điclorometan (20ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất trung gian có công thức 1n (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ 1:1) (710mg) mà được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

LC/MS: chất đồng phân rửa giải thứ nhất $t_r = 2,91$ phút, MS $m/z = 696,28$ $[M+1]$, chất đồng phân rửa giải thứ hai $t_r = 3,02$ phút, MS $m/z = 696,19$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6µ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2µl/phút.



Chất trung gian 1o - N-(7-((2S,3R,4S)-5-xyano-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymetyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

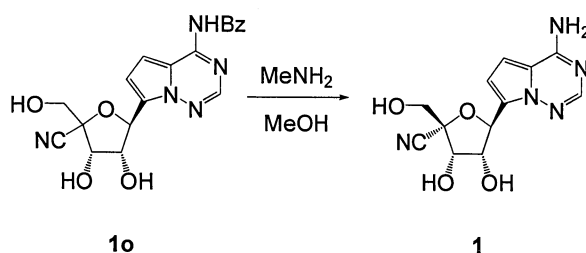
Xezi florua (729mg, 4,8mmol) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian thô có công thức 1n (668,23mg, 0,96mmol) trong DMF (9,6ml). Sau thời gian 5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước muối (100ml), và hỗn hợp thu được được chiết bằng điclorometan (3 x 100ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất trung

gian có công thức 1o (theo tỷ lệ 1:1 hỗn hợp chất đồng phân không đối quang) mà được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

LC/MS: chất đồng phân rửa giải thứ nhất $t_R = 1,31$ phút, MS $m/z = 396,19$ $[M+1]$, chất đồng phân rửa giải thứ hai $t_R = 1,32$ phút, MS $m/z = 396,19$ $[M+1]$,; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.



Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - (2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-đihydroxy-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-cacbonitril.

Metylamin (40% trong nước, 0,3ml) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian thô có công thức 1o trong metanol (1ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 2,5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm, và được tinh chế một cách trực tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (Phenominex Luna 5u C18 100Å 100 x 30mm cột, 5% đến 15% axetonitril/nước gradient, 25 phút). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn và 4' anome được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm. Sau đó, các 4' anome được tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (Phenominex Luna 5u C18 100Å 100 x 30mm cột, 5% đến 15% axetonitril/nước gradient, 25 phút). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 1.

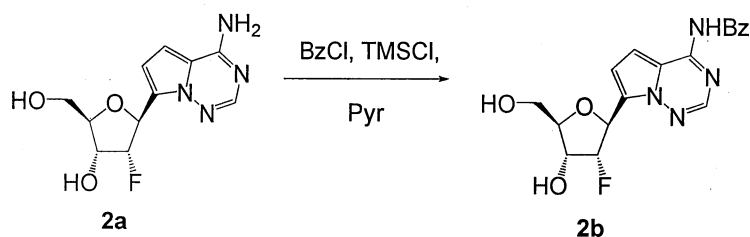
^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,79 (s, 1H), 6,85 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,76 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,45 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 4,59 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,40 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,88 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), 3,80 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H).

LC/MS: $t_R = 0,29$ phút, MS $m/z = 292,16$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 4,6\text{mm}$

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở $2\mu\text{l/phút}$.

HPLC: $t_R = 0,377$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5μ C18 110A, $50 \times 4,6\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút ; sắc ký lỏng cao áp: $t_R = 6,643$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Luna 5μ C18(2) 110A, $250 \times 4,6\text{mm}$; các dung môi: axetonitril, Nước; Gradient: 5% đến 15% ACN trong thời gian 10 phút ở 2ml/phút



Chất trung gian 2b - N-(7-((2S,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Chất trung gian có công thức 2a, (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (điều chế được theo WO2012037038A1, 1,20g, 4,01mmol) (được làm khô bằng cách đồng bay hơi với pyridin 3 lần) mà sau đó được hòa tan trong pyridin (18ml) được bổ sung vào bình được sục N_2 . Clotrimetylsilan (1,54ml, 13,13mmol) được bổ sung một lần ở 0°C và hỗn hợp thu được được khuấy trong khí quyển N_2 trong thời gian 1 giờ. Benzoyl clorua (675 μl , 5,82mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 1

giờ. Thêm phần benzoyl clorua (100 μ l) được bổ sung để tiêu thụ nguyên liệu ban đầu còn lại. Hỗn hợp gồm các sản phẩm được bảo vệ mono- và bis-Bz được quan sát thấy. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng H₂O (5ml), và hỗn hợp thu được được khuấy trong thời gian 5 phút. Sau đó, dung dịch NH₄OH_(nước) đặc (8ml) được bổ sung vào một lần và để khuấy trong thời gian 15 phút, tại thời điểm đó sản phẩm bis-Bz được chuyển hóa thành sản phẩm mong muốn. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó cặn được đông bay hơi với CH₃OH. Chất trung gian có công thức 2b được phân tách sau khi tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải ramp 50% đến 100% EtOAc trong hexan.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8,26 – 7,91 (m, 2H), 7,88 – 7,79 (m, 1H), 7,61 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,56 – 7,36 (m, 2H), 7,37 – 7,24 (m, 1H), 7,10 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 7,01 (s, 1H), 5,53 (d, J = 23,4 Hz, 1H), 5,45 (d, J = 6,5 Hz, 1H), 5,16 – 4,91 (m, 1H), 4,86 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,21 – 4,04 (m, 1H), 3,82 (dd, J = 8,0, 3,9 Hz, 1H), 3,71 (ddd, J = 12,3, 5,6, 2,6 Hz, 1H), 3,52 (ddd, J = 12,2, 5,7, 4,5 Hz, 1H).

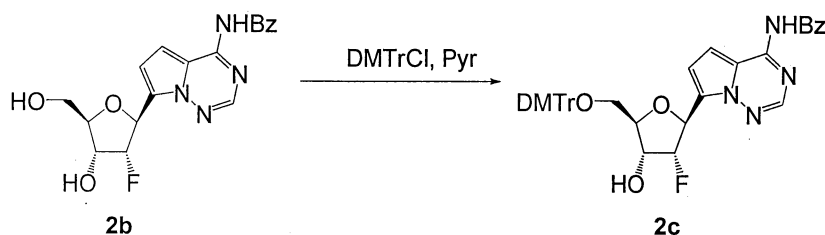
¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -196,33 (dt, J = 55,1, 22,5 Hz).

LC/MS: t_R = 0,77 phút, MS m/z = 373,14 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian có công thức 2b (1,3g, 3,49mmol) được làm khô bằng cách đồng bay hơi với pyridin. Sau đó, nguyên liệu đã sấy khô được hòa tan trong pyridin (15ml) trong khí quyển N₂. 4,4'-dimethoxytrityl clorua (1,71g, 5,0mmol) được bổ sung một lần nữa nhiệt độ trong phòng và để khuấy trong thời gian 2 giờ. Etanol (2ml) được bổ sung vào và dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 5 phút. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 100% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2c.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8,28 – 8,02 (m, 2H), 7,61 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,36 (ddt, J = 6,0, 4,7, 2,0 Hz, 2H), 7,31 – 7,04 (m, 7H), 6,90 – 6,73 (m, 4H), 5,62 (d, J = 24,4 Hz, 1H), 5,49 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 5,27 – 5,01 (m, 1H), 4,32 – 4,13 (m, 1H), 4,06 – 3,95 (m, 1H), 3,69 (s, 4H), 3,28 (s, 3H), 3,12 (dd, J = 10,4, 5,2 Hz, 1H).

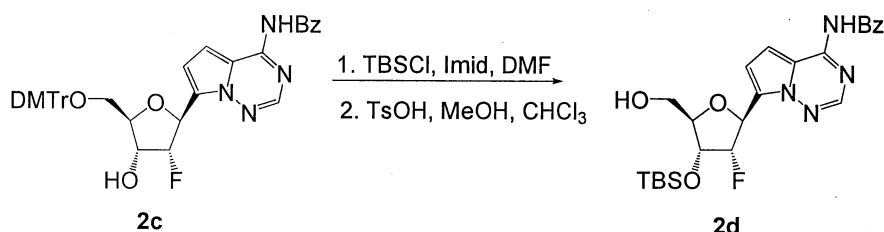
¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -195,58 (dt, J = 52,1, 24,7 Hz).

LC/MS: t_R = 1,37 phút, MS m/z = 675,29 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2d - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimethylsilyloxy)-3-fluoro-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Imidazol (251mg, 3,70mmol), tiếp theo Tert-butylclodimethylsilan (492mg, 3,27mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian 2c (1,47g, 2,18mmol) trong

DMF (8ml), được điều chế trong khí quyển N_2 . Dung dịch này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Dung dịch này được pha loãng bằng H_2O (5ml) và sau đó các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được phân bố giữa EtOAc và H_2O . Sau đó, các lớp được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , mà được loại bỏ bằng cách lọc, và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được dùng như vậy ở bước tiếp theo.

Nguyên liệu thô được hòa tan trong $CHCl_3$ (15ml) và làm lạnh đến $0^\circ C$. Axit p-toluensulfonic hydrat (414mg, 2,18mmol) được hòa tan trong CH_3OH (6ml) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp này và để khuấy trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa_(nước). Các chất hữu cơ được rửa bằng nước muối và làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 50% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2d.

1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,21 – 7,98 (m, 2H), 7,51 (dt, $J = 39,9, 7,5$ Hz, 3H), 7,12 – 6,86 (m, 2H), 5,48 (d, $J = 21,9$ Hz, 1H), 5,07 (dt, $J = 54,6, 3,8$ Hz, 1H), 4,86 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,28 (ddd, $J = 17,8, 7,1, 4,4$ Hz, 1H), 3,83 – 3,72 (m, 1H), 3,63 (ddd, $J = 12,1, 5,2, 3,0$ Hz, 1H), 3,43 (ddd, $J = 12,1, 6,0, 4,2$ Hz, 1H), 0,80 (s, 9H), 0,01 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

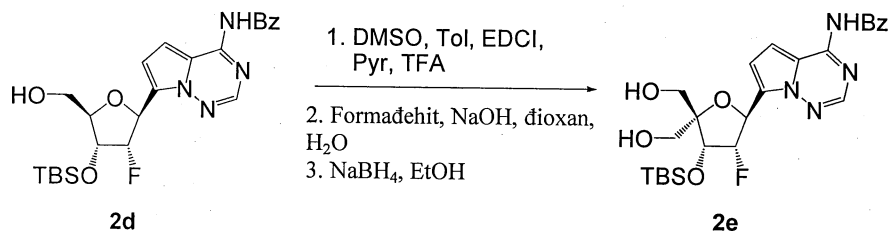
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -198,05 (dt, $J = 54,2, 19,8$ Hz).

LC/MS: $t_R = 1,35$ phút, MS $m/z = 487,24$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2e - N-(7-((2S,3S,4R)-4-(Tert-butylđimetylsilyloxy)-3-flo-5,5-bis(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDCI) (504mg, 2,63mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 2d (856mg, 1,75mmol) trong toluen (4ml), và DMSO (6ml) được điều chế trong khí quyển N_2 . Pyridin (150 μl), và TFA (70 μl) được bổ sung vào hỗn hợp này và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 15 phút. Thêm EDCI (100mg) và pyridin (100 μl) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong thêm 45 phút. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng H_2O (10ml) và CH_2Cl_2 (10ml). Các chất hữu cơ được rửa bằng nước muối và làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra aldehyt thô, mà được dùng trong bước tiếp theo.

Aldehyt thô được hòa tan trong đioxan (5ml) và 37% formaldehyt_(nước) (925 μl) được bổ sung, tiếp theo là dung dịch $\text{NaOH}_{(\text{nước})}$ 2N (925 μl). Sau khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng AcOH, pha loãng bằng EtOAc, và rửa bằng H_2O . Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm aldol thô, mà được đưa nguyên như vậy sang bước tiếp theo.

Sản phẩm aldol thô được hòa tan trong EtOH (9ml) trong khí quyển N_2 và làm lạnh đến 0°C . NaBH_4 (80mg, 2,1mmol) được bổ sung một lần và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 10 phút. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng AcOH, pha loãng bằng CH_2Cl_2 và rửa bằng dung dịch 1:1 chứa nước và dung dịch $\text{NaHCO}_3_{(\text{nước})}$ bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng ramp dung môi rửa giải từ 0% đến 100% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2e.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,20 – 7,99 (m, 2H), 7,51 (dt, J = 39,5, 7,5 Hz, 3H), 7,15 – 6,93 (m, 2H), 5,50 (d, J = 14,1 Hz, 1H), 5,24 (dt, J = 54,2, 5,4 Hz, 1H), 4,78 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,48 (dd, J = 10,7, 4,8 Hz, 1H), 4,34 (dd, J = 6,7, 4,9 Hz, 1H), 3,62 (dd, J = 11,9, 4,9 Hz, 1H), 3,55 – 3,35 (m, 3H), 0,82 (s, 9H), 0,07 (s, 3H), -0,09 (s, 3H).

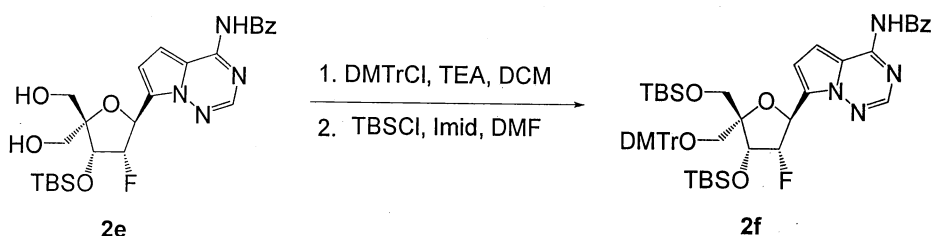
^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -200,37 (d, J = 51,1 Hz).

LC/MS: t_R = 1,25 phút, MS m/z = 517,21 $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2f - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-5-((tert-butyldimethylsilyloxy)methyl)-3-fluorotetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Chất trung gian có công thức 2e (370mg, 0,717mmol) được hòa tan trong CH_2Cl_2 (10ml) và TEA (200 μ l) trong khí quyển N_2 , và sau đó được làm lạnh đến 0°C . 4,4'-đimethoxytrityl clorua 4,4'-đimethoxytrityl clorua (0,364g, 1,07mmol) được bổ sung một lần và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời gian 30 phút. CH_3OH (2ml) được bổ sung vào và dung dịch được pha loãng bằng CH_2Cl_2 và dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Lốp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 5% đến 100% EtOAc trong

hexan, để tạo ra sản phẩm thô ở dạng hỗn hợp gồm bis-DMTr và các sản phẩm 4'β. Hỗn hợp này được chuyển thẳng không cần tinh chế thêm.

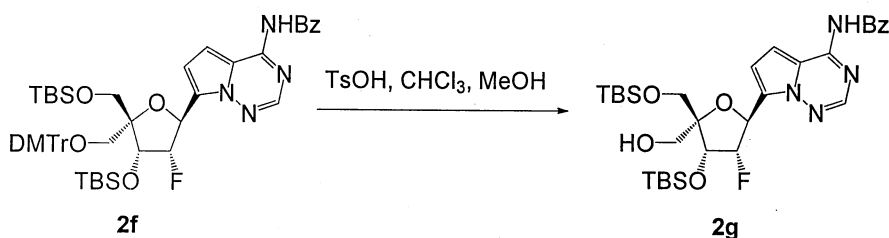
Imidazol (143mg, 2,10mmol), tiếp theo là tert-butylclodimetylsilan (158mg, 1,05mmol) được bổ sung vào sản phẩm thô (574mg, dạng hỗn hợp) trong DMF (3ml), trong khí quyển N₂. Dung dịch này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Dung dịch này được pha loãng bằng CH₃OH (1ml) và EtOAc. Các chất hữu cơ được rửa bằng H₂O và sau đó bằng nước muối. Lốp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 50% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2f mà chứa một phần nguyên liệu bis-DMTr.

LC/MS: t_R = 2,25 phút, MS m/z = 933,52 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2g - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-((tert-butylđimetylsilyloxy)metyl)-3-flo-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f]-[1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Chất trung gian có công thức 2f được hòa tan trong CHCl₃ (5ml) và làm lạnh đến 0°C. Axit p-toluensulfonic hydrat (90mg, 0,474mmol), hòa tan trong CH₃OH (4ml) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp này và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời

gian 5 phút. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Các chất hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 40% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2g.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,09 – 7,88 (m, 2H), 7,48 (dt, $J = 35,4, 7,4$ Hz, 3H), 7,30 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 5,69 (dd, $J = 18,8, 4,2$ Hz, 1H), 5,05 (dt, $J = 54,6, 4,7$ Hz, 1H), 4,62 (dd, $J = 14,9, 5,1$ Hz, 1H), 3,91 – 3,64 (m, 3H), 0,92 – 0,70 (m, 18H), 0,13 – 0,04 (m, 6H), 0,01 (m, 6H).

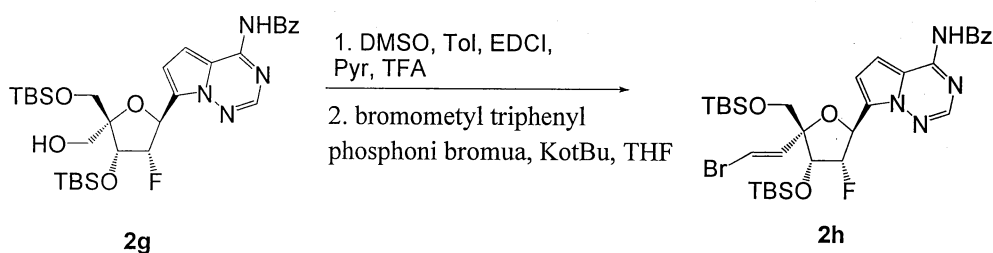
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -196 (m)

LC/MS: $t_R = 2,61$ phút, MS $m/z = 631,43$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2h - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-5-((E)-2-bromvinyl)-4-(tert-butylđimethylsilyloxy)-5-((tert-butylđimethylsilyloxy)metyl)-3-flotetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (EDCI) (208mg, 1,08mmol) trong khí quyển N_2 được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 2g (228mg, 0,361mmol) trong toluen (0,75ml), và DMSO (0,15ml). Pyridin (30 μ l), và TFA (15 μ l) được bổ sung vào hỗn hợp này và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ

trong phòng trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng H₂O tiếp theo là nước muối. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra aldehyt thô. Nguyên liệu này được dùng cho bước tiếp theo.

KOtBu (1,0M trong THF, 1,08ml, 1,08mmol) được bổ sung vào huyền phù chứa bromomethyltriphenylphosphoni bromua (314mg, 0,72mmol) trong THF (4ml) ở -40°C và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 2 giờ trong khí quyển N₂. Aldehyt thô được hòa tan trong THF (4ml) và được bổ sung nhỏ giọt vào. Hỗn hợp phản ứng này được lấy ra khỏi bể làm lạnh và để ấm đến 10°C trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội lại đến -40°C và hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng NH₄Cl_(nước) bão hòa. Các lớp được tách và các chất hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa 0% đến 50% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2h.

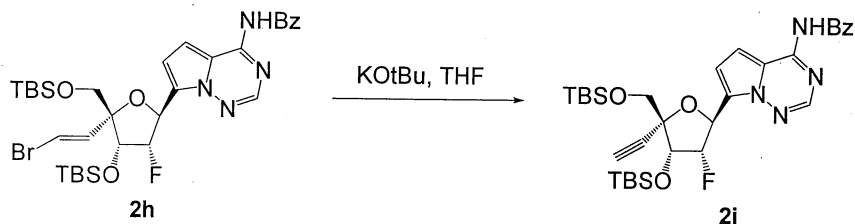
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,08 – 7,85 (m, 2H), 7,62 – 7,36 (m, 2H), 7,34 – 7,01 (m, 3H), 6,92 (s, 1H), 6,60 – 6,45 (m, 1H), 6,35 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,61 (d, J = 25,1 Hz, 1H), 4,82 (dd, J = 56,3, 4,9 Hz, 1H), 4,69 – 4,46 (m, 1H), 3,97 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 3,53 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 0,84 (d, J = 3,9 Hz, 18H), 0,13 – -0,10 (m, 12H).

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -190,60 (m).

LC/MS: t_R = 2,10 phút, MS m/z = 705,54/707,29 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2i - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-((tert-butyl đimetylsilyloxy)metyl)-5-etynyl-3-flotetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Chất trung gian có công thức 2h (204mg, 0,289mmol) được hòa tan trong THF (8ml) trong khí quyển N_2 và làm lạnh đến -40°C . KOtBu (1,0M trong THF, 1,08ml, 1,08mmol) được bổ sung từ từ vào vào. Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời gian 20 phút khi được tôi bằng dung dịch $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{nước})}$ bão hòa. Dung dịch này được pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng nước muối. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 50% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2i.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,12 – 7,88 (m, 2H), 7,51 (dt, $J = 36,5, 7,5$ Hz, 2H), 7,32 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 5,79 (d, $J = 22,1$ Hz, 1H), 5,02 (ddd, $J = 55,3, 5,1, 3,2$ Hz, 1H), 4,56 (dd, $J = 18,1, 5,1$ Hz, 1H), 3,91 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H), 3,83 – 3,62 (m, 1H), 2,55 (m, 1H), 0,90 (dd, $J = 25,3, 1,6$ Hz, 18H), 0,20 – -0,08 (m, 12H).

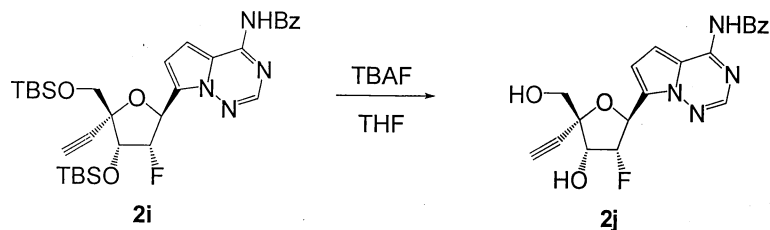
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -193,10 (dải - s).

LC/MS: $t_R = 1,88$ phút, MS $m/z = 625,24$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 2j - N-(7-((2S,3R,4R,5R)-5-etynyl-3-flo-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

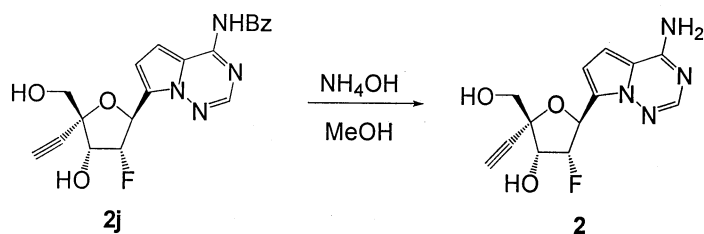
TBAF (1,0M trong THF, 700 μ l, 0,700mmol) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 2i (152mg, 0,243mmol) trong THF (3,5ml) trong khí quyển N₂ và hỗn hợp này được để khuấy trong thời gian 30 phút. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 40% đến 100% EtOAc trong hexan, để tạo ra chất trung gian có công thức 2j.

LC/MS: t_R = 0,88 phút, MS m/z = 397,16 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Ví dụ 2 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-etynyl-4-flo-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol.

NH₄OH_(nước) (0,7ml) đậm đặc được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 2j (71mg, 0,179mmol) trong CH₃OH (2ml) và dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện

áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 20% CH₃OH trong CH₂Cl₂, tiếp theo sắc ký lỏng cao áp pha đảo, bằng cách sử dụng dung môi rửa giải chứa từ 0% đến 20% ACN trong H₂O, để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 2.

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,77 (s, 1H), 6,90 – 6,70 (m, 2H), 5,62 (dd, J = 25,5, 2,6 Hz, 1H), 5,18 (ddd, J = 56,0, 5,4, 2,7 Hz, 1H), 4,57 (dd, J = 20,5, 5,4 Hz, 1H), 3,93 – 3,59 (m, 2H), 3,02 (d, J = 0,7 Hz, 1H).

¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃OD) δ -193,76 (ddd, J = 56,0, 25,5, 20,4 Hz).

LC/MS: t_R = 0,45 phút, MS m/z = 293,13 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

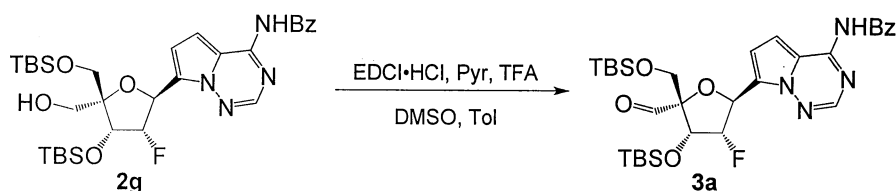
Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.

HPLC: t_R = 3,112 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100

Cột: Phenomenex Kinetex C18 2,6μm 100A, 4,6 x 100mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA

Gradient: 0 phút đến 8,0 phút 2% đến 98% ACN ở 1,5ml/phút.



Chất trung gian 3a - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-((tert-butylđimetylsilyloxy)metyl)-3-flo-5-formyltetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

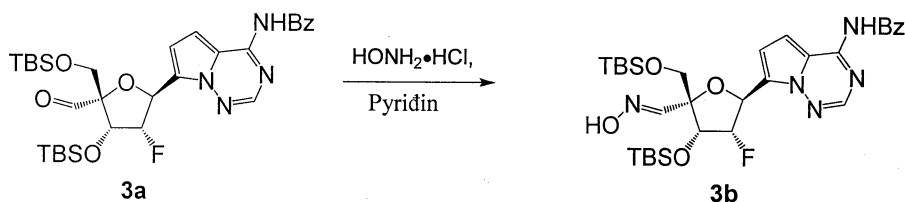
EDCIHCl (1,02g, 5,36mmol) và pyridin (149 μ l, 1,92mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 2g (1,13g, 1,79mmol) trong DMSO (1ml) và toluen (10ml), được điều chế trong khí quyển N₂. TFA (74 μ l, 0,97mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào. Sau 1 giờ, phản ứng được kiểm tra theo phương pháp LC/MS. Pic đơn quan sát thấy, với thời gian lưu tương tự thời gian của nguyên liệu ban đầu song có pic M+1 bằng pic mong đợi đối với sản phẩm. 50 μ l pyridin nữa được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 15 phút nữa. Không có thay đổi theo phương pháp LC/MS. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc và được tối bằng hỗn hợp dung dịch NaHCO₃(nước) bão hòa và H₂O theo tỷ lệ 1:1. Hỗn hợp này được phân bố giữa EtOAc và thêm H₂O. Lớp hữu cơ được tách và rửa bằng H₂O, nước muối, và sau đó được làm khô trên Na₂SO₄. Tác nhân làm khô được loại bỏ bằng cách lọc chân không và dịch lọc được cô. Cặn được đưa vào CH₂Cl₂, cô, và chất liệu thu được được đặt trong chân không cao trong thời gian 1 giờ. Sản phẩm, chất trung gian có công thức 3a được dùng trong phản ứng tiếp theo.

LC/MS: t_R = 1,90 phút, MS m/z = 629,46 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 3b - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-((tert-butylđimetylsilyloxy)metyl)-3-flo-5-((E)-(hydroxyimino)metyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

HONH₂HCl bổ sung một lần ở nhiệt độ trong phòng vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 3a (nguyên liệu thô từ bước trước, giả sử 1,79mmol) trong

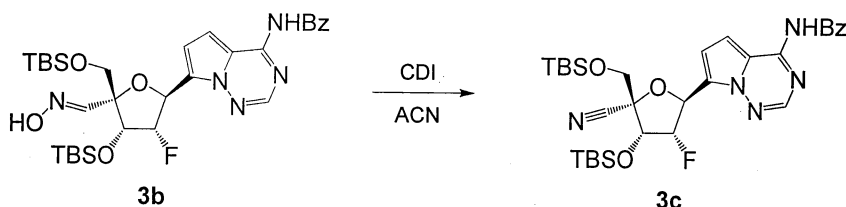
pyridin (11ml), điều chế được trong khí quyển N_2 . 5 phút sau, phản ứng được kiểm tra theo phương pháp LC/MS; nguyên liệu ban đầu đã được dùng hết. 25 phút sau, phản ứng được kiểm tra lại. Không có thay đổi so với thời điểm thứ nhất. Hỗn hợp phản ứng này được cô và cạn được phân bố giữa EtOAc và H_2O . Lốp hữu cơ được tách, rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 và lọc. Dịch lọc được cô, thu lấy trong CH_2Cl_2 , cô lại, và cạn được đưa vào chân không cao. Sản phẩm chất trung gian có công thức 3b được dùng trong phản ứng tiếp theo.

LC/MS: $t_R = 1,83$ phút, MS $m/z = 644,55$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 3c - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-((tert-butylđimetylsilyloxy)metyl)-5-xyano-3-flotetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

CDI (436mg, 2,69mmol) trong một lần được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 3b (nguyên liệu thô từ bước trước, giả sử 1,79mmol) trong ACN (16ml). Phản ứng được thực hiện trong khí quyển N_2 . Sau 20 phút, phản ứng được kiểm tra theo phương pháp LC/MS. Các pic có khối lượng của nguyên liệu ban đầu và sản phẩm được phân giải chỉ theo thời gian. Sau 1,5 giờ, phản ứng được kiểm tra. Pic UV tương ứng với nguyên liệu ban đầu gần như hết và mật độ của khối lượng pic bị giảm. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng CH_2Cl_2 và được tối bằng hỗn hợp gồm dung dịch $NaHCO_3$ (nước) bão hòa và H_2O theo tỷ lệ 1:1. Các lớp phân tách, phần trong nước

được chiết ngược bằng CH_2Cl_2 và các lớp hữu cơ kết hợp được chiết bằng hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 nước muối và H_2O , làm khô trên Na_2SO_4 và lọc. Dịch lọc được cô và chất trung gian có công thức 3c được phân tách bằng cột sắc ký trên silicagel bằng cách sử dụng dung môi dưới đây nằm trong khoảng từ: 0% EtOAc trong hexan tăng lên đến 20% EtOAc trong hexan, dừng ở 20% EtOAc trong hexan và sau đó tăng lên đến 40% EtOAc trong hexan.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8,31 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,65 (t, J = 8 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 8 Hz, 1H), 7,15 (d, 4 Hz, 1H), 7,02 (s, 1H), 5,82 (d, J = 24 Hz, 1H), 5,51 (ddd, J = 52, 4,8, 2,8 Hz, 1H), 4,70 (dd, J = 18,4, 4,4 Hz, 1H), 3,94 (dd, J = 53,2, 11,2 Hz, 2H), 0,93 (s, 9H,), 0,84 (s, 9H), 0,17 (s, 3H), 0,16 (s, 3H), 0,05 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

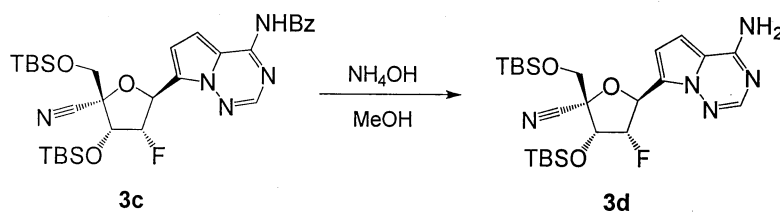
¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -194,658 (dt, J = 53, 21,4 Hz).

LC/MS: $t_R = 1,84$ phút, MS $m/z = 626,60$ [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 3d - (2R,3R,4S,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3-(tert-butylđimetylsilyloxy)-2-((tert-butylđimetylsilyloxy)metyl)-4-flotetrahyđrofuran-2-cacbonitril.

Dung dịch $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{nước})}$ (3,74ml) đậm đặc được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 3c (770mg, 1,23mmol) trong MeOH (11,2ml), đã được làm nguội trong bể nước đá. Bể làm lạnh được loại bỏ và dung dịch không đồng nhất thu được được khuấy qua đêm. Ngày tiếp theo, phản ứng chưa hoàn thành như được xác định theo

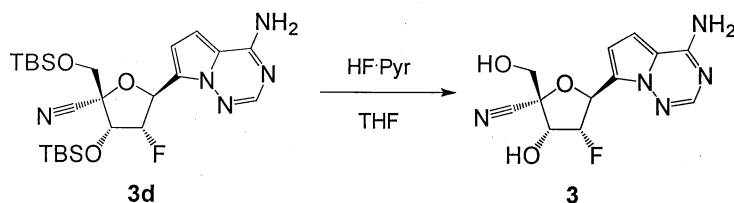
LC/MS. Thêm $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{nước})}$ đậm đặc (4ml) và 2-MeTHF (12ml) được bổ sung vào. Phản ứng trở nên đồng nhất nhưng sau 20 phút phản ứng không có tiến triển thêm nữa. Hỗn hợp phản ứng này được cô và cần được hòa tan trong THF (15ml). Dung dịch $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{nước})}$ đậm đặc (5ml) và MeOH vừa đủ (1,9ml) được bổ sung vào hỗn hợp này để chuyển dung dịch thành đồng nhất và một pha. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 22 giờ. Phản ứng gần như hoàn thành (còn lại khoảng 5% nguyên liệu ban đầu). Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng CH_2Cl_2 và H_2O . Các lớp được tách, và lớp nước được pha loãng bằng dung dịch $\text{NaHCO}_3_{(\text{nước})}$ bão hòa và chiết bằng CH_2Cl_2 . Lớp nước được trung hòa bằng dung dịch HCl 2N và sau đó được chiết bằng CH_2Cl_2 . Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên Na_2SO_4 , mà được loại bỏ bằng cách lọc. Dịch lọc được cô và chất trung gian có công thức 3d được phân lập được từ cần bằng cột sắc ký trên silicagel bằng cách sử dụng dung môi dưới đây nằm trong khoảng từ: 0% EtOAc trong hexan tăng lên đến 50% EtOAc trong hexan, dừng ở 50% EtOAc trong hexan và sau đó tăng lên đến 100% EtOAc trong hexan.

LC/MS: $t_R = 1,59$ phút, MS $m/z = 522,47$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,8 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Ví dụ 3 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-carbonitril.

70% HF·Pyridin trong pyridin (60 μ l, 0,478mmol) ở 0°C, trong khí quyển N_2 được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 3d (100mg, 0,191mmol) trong THF (2ml), trong ống polypropylen. Phản ứng được kiểm tra sau 20 phút; không có phản

ứng, nên thêm 70% HF Pyridin trong pyridin (150 μ l) được bổ sung vào và bể làm lạnh được loại bỏ. Sau 1 giờ và 50 phút, thêm 70% HF Pyridin trong pyridin (150 μ l) được bổ sung vào. Sau 2 giờ nữa, thêm 70% HF Pyridin trong pyridin (300 μ l) được bổ sung vào. Sau 2 giờ và 15 phút nữa, thêm 70% HF Pyridin trong pyridin (1ml) được bổ sung vào. Phản ứng trở nên trong và đồng nhất khi lần bổ sung 70% HF Pyridin trong pyridin cuối cùng này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy qua đêm. Phản ứng hoàn thành vào ngày tiếp theo. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội trong bể nước đá và được tôi bằng H₂O và lượng nhỏ dung dịch NaHCO₃(nước) bão hòa. Hỗn hợp này được cô và cặn được đưa vào DMSO. Nguyên liệu không hòa tan còn lại được loại bỏ bằng cách lọc và dịch lọc được bán tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Nguyên liệu cách ly được hòa tan trong DMF và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Hợp chất theo Ví dụ 3 được phân tách, với 0,5% ở dạng muối TFA.

¹H NMR (400MHz, DMF-d₇) δ 7,92 (s, 1H), 6,99 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 6,64 (d, J = 6 Hz, 1H), 5,92 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 5,83 (dd, J = 25,2, 2 Hz, 1H), 5,40 (ddd, J = 54,8, 4,8, 2,4 Hz, 1H), 4,75 (dt, J = 22, 5,2 Hz, 1H), 4,02 (dd, J = 12, 6,4Hz, 1H), 3,87 (dd, J = 12, 6,4 Hz, 1H).

¹⁹F NMR (376 MHz, DMF-d₇) δ -74,92 (s), -193,726 (dt, J = 54,5, 23,3 Hz).

LC/MS: t_R = 0,56 phút, MS m/z = 294,10 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

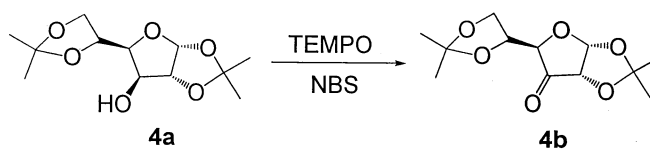
Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,8 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.

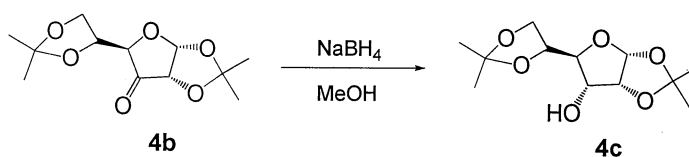
HPLC: t_R = 3,220 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Phenomenex Kinetex C18 2,6 μ m 100A, 4,6 x 100mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA

Gradient: 0 phút đến 8,0 phút 2% đến 98% ACN ở 1,5ml/phút.



Chất trung gian 4b - (3aR,5R,6aS)-5-((R)-2,2-đimetyl-1,3-đioxolan-4-yl)-2,2-đimetylđi-hydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-6(3aH)-on.

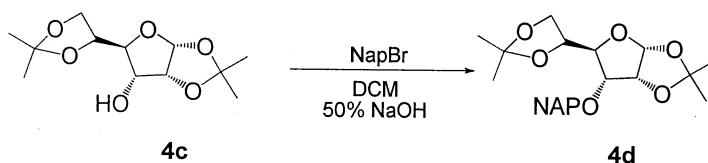
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4a, (3aR,5S,6S,6aR)-5-((R)-2,2-đimetyl-1,3-đioxolan-4-yl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-6-ol (500g, 1,90mol) trong điclorometan/nước (2,7 L / 2,3 lit) ở nhiệt độ trong phòng đặt vào trong bình đáy tròn 4 cổ loại dung tích 10l. Natri cacbonat (290g, 3,42mol) được bổ sung vào bình này. Kali cacbonat (451g, 3,24mol) được bổ sung tiếp vào. Tiếp theo là bổ sung 2,2,6,6-tetrametylpiperidinoxyl (TEMPO, 15,2g, 96,31mmol). Tetrabutylamoni bromua (31g, 95,20mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này. N-bromosuccinimide (514g, 2,86mol), thành nhiều phần ở 35°C được bổ sung vào hỗn hợp nêu trên. Dung dịch thu được để phản ứng, và khuấy, trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được chiết bằng 2 x 1l điclorometan và các lớp hữu cơ kết hợp. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 1 x 1,5l nước. Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4b (thô).



Chất trung gian 4c - (3aR,5S,6R,6aR)-5-((R)-2,2-đimetyl-1,3-đioxolan-4-yl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-6-ol.

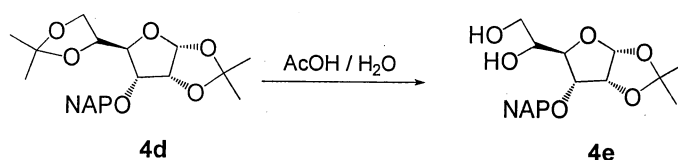
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4b (370g, 1,29mol) trong metanol (1300ml) được đặt trong bình đáy tròn 4 cổ loại dung tích 2l. Natri bohydrua (26,4g, 706,38mmol) được bổ sung thành nhiều phần ở nhiệt độ trong phòng vào bình trên. Dung dịch thu được để phản ứng, và khuấy, trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được cô trong chân không. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung 1000ml dung dịch nước amoni clorua 5% vào. Dung dịch thu được được chiết bằng 3 x 500ml điclorometan và các lớp hữu cơ kết hợp. Dung dịch thu được được rửa

bằng 2 x 300ml nước. Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách kết tinh lại ra khỏi ete dầu mỏ. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4c.



Chất trung gian 4d.

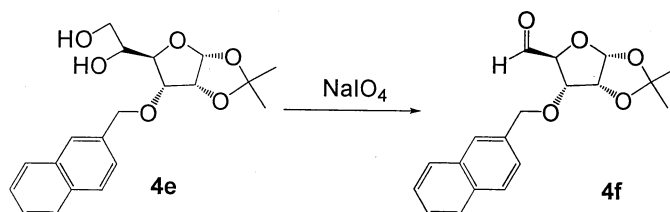
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4c (350g, 1,34mol) trong điclometan (700ml) được đưa vào bình đáy tròn 4 cổ loại dung tích 5000ml. Tetrabutylamoni bromua (476,8g, 1,48mol) được bổ sung vào bình nêu trên. 50% natri hydroxit/nước (700g) được bổ sung vào hỗn hợp này. 2-(bromometyl) naphtalen (340g, 1,54mol) được bổ sung thành vài mẻ vào hỗn hợp nêu trên. Dung dịch thu được để phản ứng, và khuấy, trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung 1800ml điclometan/nước (theo tỷ lệ 1:1) vào. Dung dịch thu được chiết bằng 2 x 1l điclometan và các lớp hữu cơ kết hợp. Hỗn hợp thu được rửa bằng 1 x 1000ml nước. Cặn được hòa tan trong 1000/1000ml ete dầu mỏ/nước. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách kết tinh lại ra khỏi ete dầu mỏ. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4d.



Chất trung gian 4e - (R)-1-((3aR,5R,6R,6aR)-2,2-dimetyl-6-(naphtalen-2-ylmetoxy)-tetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-5-yl)etan-1,2-điol.

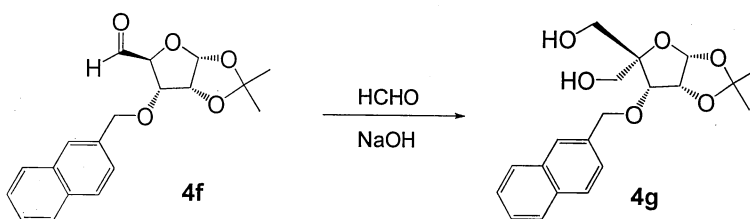
Chất trung gian có công thức 4d (500g, 1,25mol) được đưa vào bình đáy tròn 4 cổ loại dung tích 5l. Axit axetic (1,8 lit) được bổ sung vào bình này. Nước (600ml) được bổ sung vào hỗn hợp này. Dung dịch thu được được để phản ứng, và khuấy, qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các chất rắn được lọc bỏ. Dung dịch thu được được chiết bằng 3 x 1l ete dầu mỏ và các lớp nước được kết hợp. Dung dịch thu được pha loãng bằng 2l etyl axetat. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 2l natri clorua_(nước). Trị số độ pH của dung dịch được

điều chỉnh đến 8 bằng natri cacbonat (50%). Dung dịch thu được được chiết bằng 2 x 11 etyl axetat và các lớp hữu cơ kết hợp và cô trong chân không. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4e.



Chất trung gian 4f - (3aR,5S,6R,6aR)-2,2-đimetyl-6-(naphtalen-2-ylmetoxy)tetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-5-carbaldehyt.

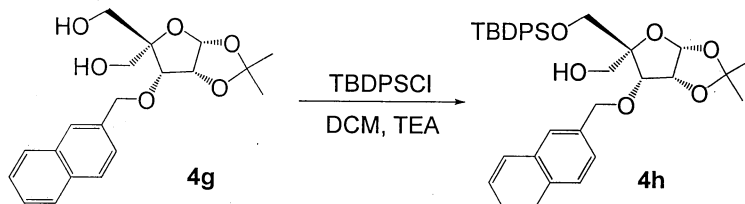
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4e (300g, 833,33mmol) trong 1,4-đioxan (2100ml) được đặt vào trong ở nhiệt độ trong phòng vào trong bình đáy tròn 4 cỡ loại dung tích 10l. Tiếp theo là bổ sung dung dịch chứa natri periodat (250g) trong nước (4000ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 0,5 giờ. Dung dịch thu được được để phản ứng, và khuấy, trong thời gian 0,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các chất rắn được lọc bỏ. Dung dịch thu được được chiết bằng 3 x 1000ml etyl axetat và các lớp hữu cơ kết hợp. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 1000ml natri clorua_(nước). Hỗn hợp thu được được cô trong chân không. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4f.



Chất trung gian 4g - ((3aR,6S,6aR)-2,2-đimetyl-6-(naphtalen-2-ylmetoxy)tetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-5,5-diyl)dimetanol.

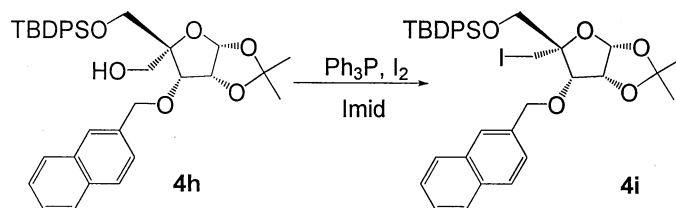
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4f (250g, 761,36mmol) trong nước/tetrahydrofuran (1250/1250ml) được đặt vào trong bình đáy tròn 4 cỡ loại dung tích 10l ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch natri hydroxit_(nước) 2N (1500ml) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp nêu trên và khuấy ở 0 đến 15°C. Formaldehyt (620ml) được bổ sung vào hỗn hợp này. Dung dịch thu được được để phản ứng, và khuấy, qua đêm ở nhiệt độ

trong phòng. Dung dịch thu được được chiết bằng 2 x 2000ml etyl axetat. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 2000ml natri clorua_(nước). Các lớp hữu cơ kết hợp và làm khô trên natri sulfat khan. Cặn được đưa vào cột silicagel với ete dầu mỏ:etyl axetat (2/1). Sản phẩm thô được kết tinh lại ra khỏi etyl axetat:etanol theo tỷ lệ 1g/(1ml:1ml). Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4g.



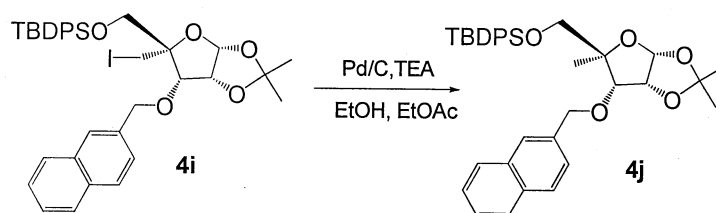
Chất trung gian 4h - ((3aR,5R,6S,6aR)-5-((tert-butyldiphenylsilyloxy)methyl)-2,2-dimetyl-6-(naphthalen-2-ylmetoxy)tetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-5-yl)metanol.

Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4g (125g, 346,84mmol) trong điclorometan (2500ml) ở nhiệt độ trong phòng được đưa vào bình đáy tròn 4 cổ loại dung tích 5l được sục và bảo quản bằng khí quyển trơ là nitơ. Trietylamin (157,5ml) được bổ sung vào hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng. Tert-butyldiphenylsilyl clorua (157,5ml) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp nêu trên và khuấy ở 0°C đến 10°C. Dung dịch thu được được để phản ứng, và khuấy, qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung 37,5ml metanol vào. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 500ml hydroclorua_(nước) 5% và 2 x 500ml natri bicacbonat_(nước). Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 500ml natri hydroxit_(nước) 1N. Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách kết tinh lại ra khỏi điclorometan/hexan. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4h.



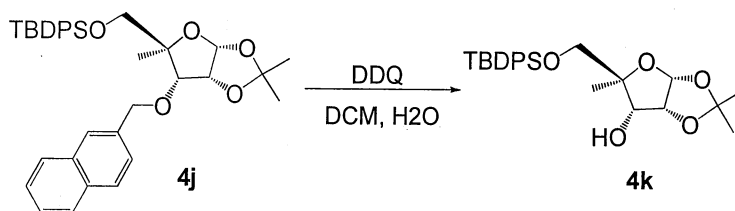
Chất trung gian 4i - Tert-butyl(((3aR,5R,6S,6aR)-5-(iodomethyl)-2,2-dimetyl-6-(naphthalen-2-ylmetoxy)tetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-5-yl)metoxy)điphenylsilan.

Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4h (20g, 31,73mmol) trong toluen (320ml), triphenylphosphin (35g, 132,11mmol), imidazol (8,96g, 132,26mmol) được đưa vào trong bình đáy tròn 3 cổ loại dung tích 1000ml được sục và bảo quản bằng khí quyển trơ là nitơ. Tiếp theo là bổ sung iot (16,95g, 66,8mmol) trong vài mẻ ở 60°C. Dung dịch thu được được khuấy qua đêm ở 80°C trong bể dầu. Hỗn hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng với bể nước/đá. Dung dịch thu được được pha loãng bằng 1000ml etyl axetat. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 300ml natri thiosulfat_(nước). Hỗn hợp thu được được rửa bằng 1 x 300ml natri clorua_(nước). Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Cặn được đưa vào cột silicagel với etyl axetat/ete dầu mỏ (theo tỷ lệ 1:10). Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4i.



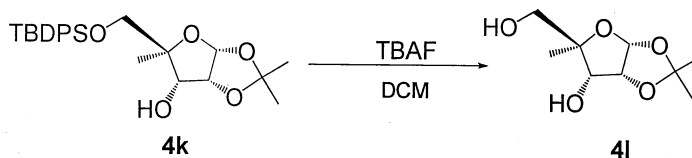
Chất trung gian 4j - Tert-butylđiphenyl(((3aR,5R,6S,6aR)-2,2,5-trimetyl-6-(naphthalen-2-ylmetoxy)tetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-5-yl)metoxy)silan.

Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4i (66g, 88,47mmol) trong ethanol/etyl axetat (600/600ml), triethylamin (20,7g, 202,52mmol), paladi trên cacbon (10% trọng lượng, 24,8g, 23,30mmol) được đưa vào trong bình đáy tròn 2000ml được sục và bảo quản bằng khí quyển trơ là nitơ. Dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 3 giờ ở 40°C. Các chất rắn được lọc bỏ. Hỗn hợp thu được được cô trong chân không. Dung dịch thu được pha loãng bằng 1500ml etyl axetat. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 1 x 500ml natri clorua_(nước). Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4j.



Chất trung gian 4k - (3aR,5R,6S,6aR)-5-((tert-butylidiphenylsilyloxy)methyl)-2,2,5-trimethyltetrahydrofuro[3,2-d][1,3]đioxol-6-ol.

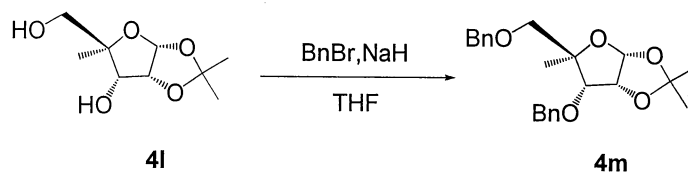
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4j (1,0g, 1,63mmol) trong điclometan (15ml), nước (1,25ml), và 2,3-điclo-5,6-đixyano-1,4-benzoquinon (DDQ, 780mg, 3,40mmol) được đưa vào bình đáy tròn loại dung tích 500ml. Dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được pha loãng bằng 50ml điclometan. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 1 x 30ml nước và 2 x 30ml natri bicacbonat_(nước). Hỗn hợp thu được được rửa bằng 1 x 30ml natri clorua_(nước). Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Cặn được đưa vào cột silicagel với etyl axetat/ete dầu mỏ (theo tỷ lệ 1:20~1:10). Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4k.



Chất trung gian 4l - (3aR,5R,6S,6aR)-5-(hydroxymetyl)-2,2,5-trimetyltetrahydrofuro[3,2-d][1,3]dioxol-6-ol.

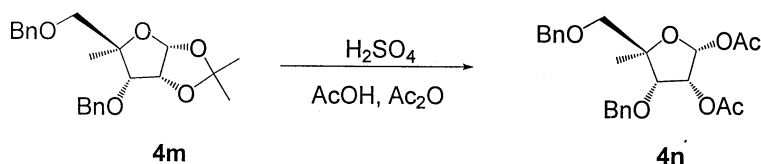
Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4k (520mg, 1,12mmol) trong tetrahydrofuran (9ml), tetrabutylamoni florua (369mg, 1,40mmol) được đưa vào bình đáy tròn loại dung tích 50ml. Dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được cô trong chân không. Cặn được đưa vào cột silicagel với diclometan/metanol (100:1). Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4l.

¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 5,64 (d, J = 3,9Hz, 1H), 4,96 (d, J = 6,6Hz, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,55 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,24 – 3,30 (m, 1H), 3,11 – 3,18 (m, 1H), 1,50 (s, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,16 (s, 1H).



Chất trung gian 4m - (3aR,5R,6S,6aR)-6-(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-2,2,5-trimethyltetrahydrofuro[3,2-d][1,3]dioxol.

Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4l (180mg, 0,84mmol) trong tetrahydrofuran (4ml) được đưa vào bình đáy tròn 3 cổ loại dung tích 50ml được sục và bảo quản bằng khí quyển trơ là nitơ. Tiếp theo, natri hydrua (60% trọng lượng, 140mg, 3,50mmol) được bổ sung vào thành nhiều phần ở 0°C. Dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 30 phút ở 0°C. Dung dịch thu được được để phản ứng, và khuấy, thêm 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Benzyl bromua (452mg, 2,62mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào bình này và khuấy ở 0°C. Dung dịch thu được được để phản ứng, và khuấy, thêm 3 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung 30ml amoni clorua_(nước). Dung dịch thu được được chiết bằng 50ml diclometan và các lớp hữu cơ được kết hợp và làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Cặn được đưa vào cột silicagel với etyl axetat/ete dầu mỏ (theo tỷ lệ 1:30 đến 1:20). Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4m.

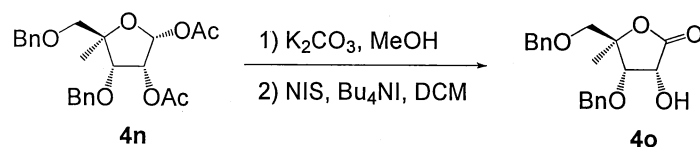


Chất trung gian 4n - (2R,3R,4S,5R)-4-(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-5-metyltetrahydrofuran-2,3-diyl điaxetat.

Chất trung gian có công thức 4m (còn điều chế được theo Biosci. Biotech. Biochem. 1993, 57, 1433-1438, 45g, 111,19mmol), axit axetic (270ml), axetic anhydrit (90ml), axit sulfuric (45d) được đưa vào bình đáy tròn loại dung tích 1000ml. Dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung 1000ml nước/đá. Dung dịch thu được pha loãng bằng 3000ml etyl axetat. Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 1000ml nước và 4 x 1000ml natri bicacbonat_(nước). Hỗn hợp thu được được rửa bằng 2 x 1000ml natri clorua_(nước). Hỗn hợp này được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong chân không. Cặn được đưa vào cột silicagel với etyl axetat/ete dầu mỏ (theo tỷ lệ 1:30 đến 1:20). Bước này tạo ra chất trung gian có công thức 4n.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 7,28 – 7,38 (m, 10H), 6,13 (s, 1H), 5,37 (d, $J = 4,8\text{Hz}$, 1H), 4,44 – 4,68 (m, 4H), 4,33 (d, $J = 5,1\text{Hz}$, 1H), 3,33 – 3,45 (m, 2H), 2,15 (s, 3H), 1,88 (s, 3H), 1,35 (s, 3H).

MS $m/z = 451[\text{M}+\text{Na}]$



Chất trung gian 4o - (3R,4S,5R)-4-(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-3-hydroxy-5-methyl-đihydrofuran-2(3H)-on.

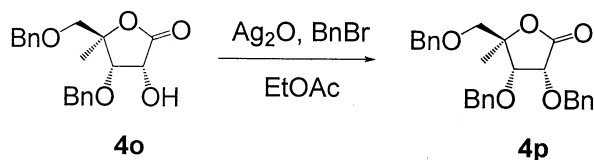
Chất trung gian có công thức 4n (1,3g, 3mmol) được hòa tan trong khan MeOH (15ml). Bột kali cacbonat (456mg, 3,3mmol) được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 1 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Axetonitril được bổ sung vào và khuấy trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp được lọc bỏ không hòa tan và rửa bằng axetonitril. Dịch lọc đặc trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan nguyên liệu thu được trong DCM khan (20ml). Tetrabutylamoni iot (1,66g, 4,5mmol) và N-iodo-succinimit (NIS, 1,69g, 2,5mmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong bóng tối trong thời gian 16 giờ. Thêm NIS (0,85g, 1,25mmol) được bổ sung và khuấy trong thời gian 4 giờ. Thêm NIS (0,85g, 1,25mmol) được bổ sung và khuấy trong thời gian 2 ngày trong bóng tối. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch nước natri thiosulfat hai lần và sau đó bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa dung dịch. Hỗn hợp được sấy khô phần hữu cơ trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế bằng cột silicagel (0% đến 30% EtOAc trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 4o.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7,35 – 7,22 (m, 10H), 4,82 (bs, 1H), 4,75 – 4,66 (m, 2H), 4,55 – 4,44 (m, 2H), 4,13 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H), 3,70 - 3,45 (m, 2H), 1,38 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 2,58$ phút, MS $m/z = 342,9 [\text{M}+1]$, 360,0 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]$; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage; Phenomenex Gemini, C_{18} , 5u, 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đệm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril

5% đến 100% dung dịch đậm B trong 2,5 phút then 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.

HPLC: t_R = 3,78 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đậm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đậm B: 0,05% TFA trong axetonitril; 2% đến 98% dung dịch đậm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.



Chất trung gian 4p - (3R,4S,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymetyl)-5-metyldi-hydrofuran-2(3H)-on.

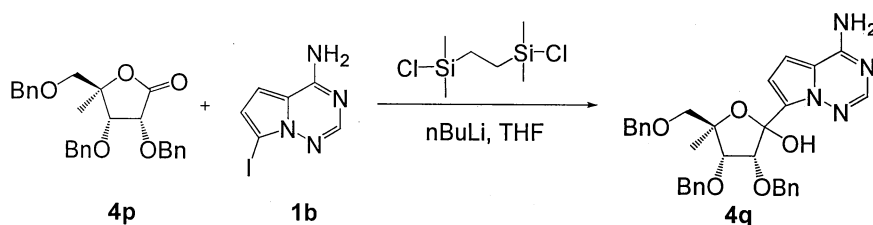
Chất trung gian có công thức 4o (955mg, 2,79mmol) hòa tan trong EtOAc (10ml). Benzyl bromua (400μl, 3,35mmol) và bạc oxit (I) (712mg, 3,07mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp được khuấy ở 60°C ở điều kiện N₂ (khí) trong bóng tối trong thời gian 3 giờ. Thêm benzyl bromua (400μl, 3,35mmol) được bổ sung vào và khuấy ở 60°C ở điều kiện N₂ (khí) trong bóng tối trong thời gian 16 giờ. Thêm bạc oxit (I) (350mg, 1,5mmol) được bổ sung vào và khuấy ở 60°C dưới điều kiện N₂ (khí) trong bóng tối trong thời gian 8 giờ. Hỗn hợp này được làm mát đến nhiệt độ trong phòng. Các chất rắn được lọc bỏ và rửa bằng EtOAc. Dịch lọc đặc trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu. Hexan được bổ sung vào và khuấy trong thời gian 2 giờ để tạo ra chất rắn. Chất rắn được gom và rửa bằng hexan. Chất rắn được sấy khô trong chân không cao để tạo ra chất trung gian có công thức 4p.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7,35 – 7,16 (m, 15H), 5,03 (d, J = 12Hz, 1H), 4,79 – 4,71 (m, 2H), 4,52 – 4,40 (m, 4H), 4,06 (d, J = 6Hz, 1H), 3,49 – 3,39 (m, 2H), 1,38 (s, 3H).

LC/MS: t_R = 2,91 phút, MS m/z = 433,1 [M+1], 450,1 [M+H₂O]; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đậm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đậm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đậm B trong 2,5 phút sau đó 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.

HPLC: $t_R = 4,54$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đệm B: 0,05% TFA trong axetonitril

2% đến 98% dung dịch đệm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.

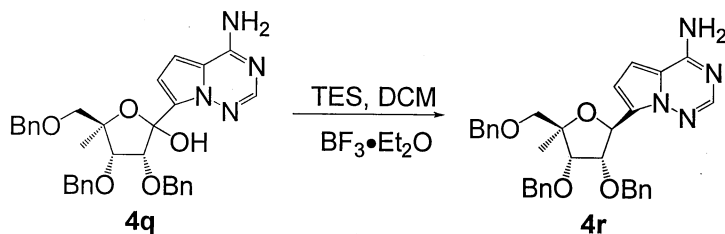


Chất trung gian 4q - (3R,4S,5R)-2-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-bis-(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-5-methyltetrahydrofuran-2-ol.

Chất trung gian có công thức 1b (148mg, 0,570mmol) và 1,2-bis(chlorodimethylsilyl)etan (123mg, 0,570mmol) được hòa tan trong THF khan (20ml) và khuấy trong khí quyển Ar(g) ở -70°C . n-butylliti (dung dịch 2,5M trong hexan, 684 μl , 1,71mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng trong khi duy trì nhiệt độ bên trong thấp hơn -65°C . Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến -40°C và giữ trong thời gian 15 phút. Dung dịch chứa chất trung gian có công thức 4p (224mg, 0,518mmol) trong THF (10ml) đã được làm lạnh trước đến -70°C , sau đó được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trong khí quyển Ar (khí). Dung dịch thu được được khuấy trong thời gian 2 giờ ở -40°C . Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được rót vào hỗn hợp khuấy gồm EtOAc và axit xitric_(nước). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong thời gian 5 phút. Lớp hữu cơ được gom và rửa bằng dung dịch NaCl_(nước) bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄ khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế để tạo ra chất trung gian có công thức 4q.

LC/MS: $t_R = 2,60$ phút, MS $m/z = 567,3$ [M+1], 565,1 [M-1]; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đệm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 2,5 phút sau đó 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.

HPLC: t_R = 3,22 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đệm B: 0,05% TFA trong axetonitril; 2% đến 98% dung dịch đệm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.



Chất trung gian 4r - 7-((2S,3S,4S,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-5-metyltetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amin.

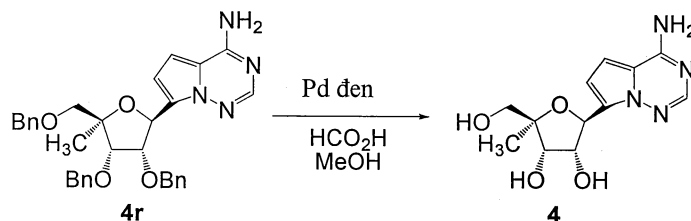
Chất trung gian có công thức 4q (81mg, 0,143mmol) được hòa tan trong khan DCM (15ml) và khuấy trong điều kiện N₂ (khí) trong bể nước đá. Trietylsilan (114μl, 0,715mmol) được bổ sung vào một lần. Bo triflorua dietyl eterat (27μl, 0,215mmol) được bổ sung nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 15 phút và sau đó loại bỏ bể làm lạnh bằng nước đá. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 60 phút. Hỗn hợp được bổ sung trietylamin (100μl, 0,715mmol) và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được hòa tan trong EtOAc và rửa bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa_(nước) (2x) và sau đó được bão hòa bằng NaCl_(nước). Chất hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄ khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế bằng cột silicagel (từ 0% đến 80% EtOAc trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 4r.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7,71 (s, 1H), 7,35 – 7,10 (m, 16H), 6,82-6,78 (m, 1H), 5,57 (d, J=4,4Hz, 1H), 4,70 – 4,45 (m, 6H), 4,25 – 4,15 (m, 2H), 3,55 – 3,40 (m, 2H), 1,42 (s, 3H).

LC/MS: t_R = 2,75 phút, MS m/z = 551,4 [M+1]; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage

Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đệm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 2,5 phút sau đó 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.

HPLC: $t_R = 3,57$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5 μ , 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đệm B: 0,05% TFA trong axetonitril; 2% đến 98% dung dịch đệm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.



Ví dụ 4 - (2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-(hydroxymetyl)-2-metyltetrahydrofuran-3,4-điol

Chất trung gian có công thức 4r (23mg, 0,042mmol) được hòa tan vào axit formic/MeOH dung dịch (theo tỷ lệ 1:9, 10ml). Paladi đen được bổ sung vào và khuấy ở 60°C trong thời gian 90 phút. Làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và lọc qua xelit. Dịch lọc đặc trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế. Hỗn hợp được cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được hòa tan trong NaHCO₃(nước) và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp trong điều kiện trung tính để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 4.

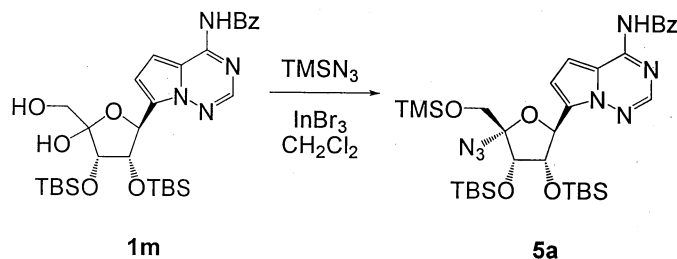
Hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế: Gilson 215 Liquid Handler; Phenomenex Gemini, C₁₈ 4 μ , 100 x 30,0mm

Chất đệm A: 0,1% dung dịch nước TFA ; dung dịch đệm B: 0,1% TFA trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 13 phút ở 20ml/phút.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8,01 (s, 1H), 7,41 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 5,33 (d, J = 8 Hz, 1H), 4,53-4,49 (m, 1H), 4,15 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 3,50 (m, 2H), 1,27 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 0,30$ min, MS m/z = 281,3 [M+1], 279,0 [M-1]; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5 μ , 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đệm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 2,5 phút sau đó 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.

HPLC: $t_R = 0,42$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5 μ , 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đệm B: 0,05% TFA trong axetonitril; 2% đến 98% dung dịch đệm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.



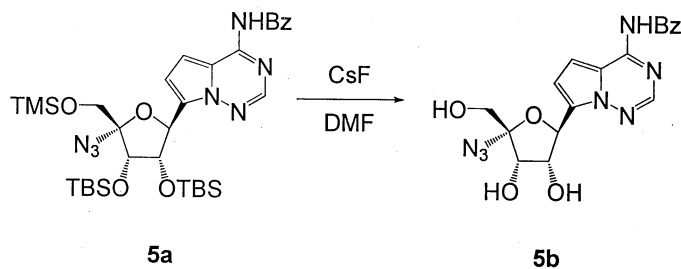
Chất trung gian 5a - N-(7-((2S,3S,4S,5R)-5-azido-3,4-bis(tert-butylđimetylsilyloxy)-5-((trimetylsilyloxy)metyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Indi (III) bromua (130mg, 0,369mmol) ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian thô có công thức 1m, N-(7-((2S,3S,4S)-3,4-bis(Tert-butylđimetylsilyloxy)-5-hydroxy-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit, (~110mg, ~0,18mmol) và azidotrimetylsilan (242 μ l, 1,84mmol) trong điclorometan (1,5ml). Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (1ml). Hỗn hợp thu được phân bố giữa điclorometan (20ml) và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (20ml). Các pha được tách và lớp nước được chiết bằng điclorometan (20ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất trung gian có công thức 5a mà được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

LC/MS: $t_R = 3,52$ phút, MS $m/z = 712,16$ [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,55 phút 100% ACN, 3,55 phút đến 4,2 phút 100% đến 2% ACN ở 2 μ l/phút.



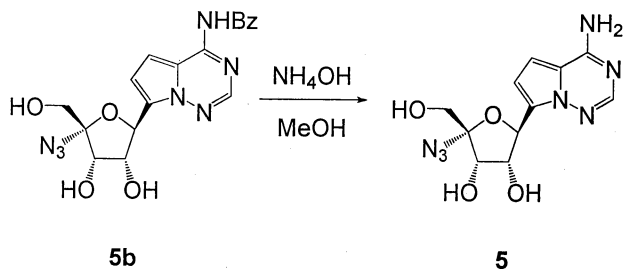
Chất trung gian 5b - N-(7-((2S,3R,4S,5R)-5-azido-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymetyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit.

Xezi florua (256mg, 1,68mmol) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian thô có công thức 5a (~120mg, ~0,168mmol) trong DMF (5ml). Sau 25 giờ, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng nước muối (100ml), và hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat (3 x 100ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất trung gian có công thức 5b mà được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

LC/MS: $t_R = 1,40$ phút, MS $m/z = 412,17$ $[M+1]$; Hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 2,46$ phút, hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Ví dụ 5 - (2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol.

Amoni hydroxit (1ml) đậm đặc được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian thô có công thức 5b trong metanol (1ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 2 ngày, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm, và được tinh chế một cách trực tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (Phenominex Synergi 4u Hydro-RR 80Å 150 x 30mm cột, 5% đến 100% axetonitril/nước gradien). Các phân đoạn chứa chất mong muốn được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế lại thông qua cột sắc ký SiO₂ (4g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 20% metanol/diclorometan) để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 5.

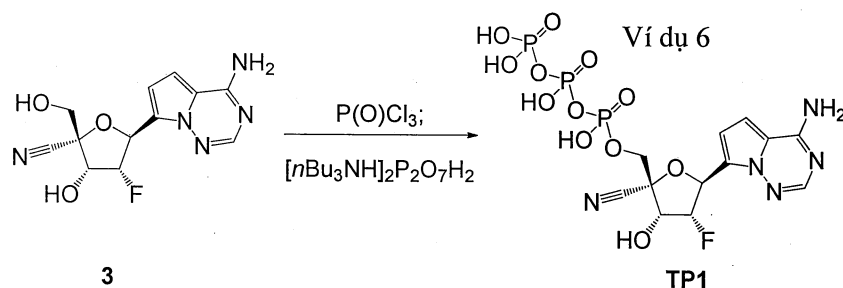
¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,79 (s, 1H), 6,86 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,51 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 4,63 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 4,37 (d, J = 5,7 Hz, 1H), 3,69 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 3,59 (d, J = 12,0 Hz, 1H).

LC/MS: t_R = 0,76 phút, MS m/z = 308,08 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradien: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2μl/phút.

HPLC: t_R = 1,287 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradien: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút;

TLC: chất rửa giải: 20% metanol trong diclorometan, R_f = 0,4 (UV)



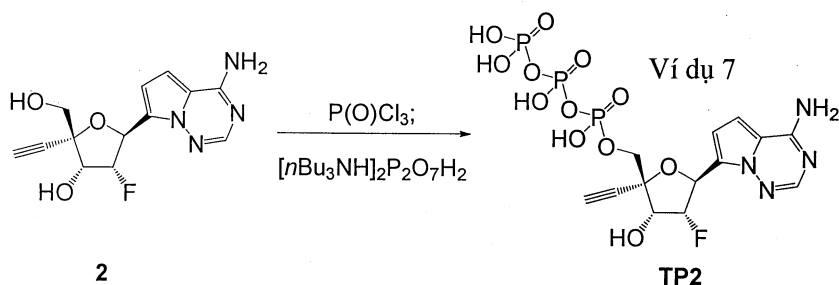
Ví dụ 6 (còn được gọi là TP-1) - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-xyano-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

Hợp chất theo Ví dụ 3 (15,0mg, 0,05mmol) được làm khô trong bình trong chân không qua đêm. Trimetylphosphat (0,5ml) và 1,8-bis(dimethylamino)naphtalen (25mg, 0,12mmol) được bổ sung vào bình này và dung dịch được để khuấy trong khí quyển N_2 được làm mát bằng bể nước đá/nước. Phospho oxyclorea (10 μ l, 0,11mmol) pha loãng được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời gian 4 giờ và làm mát. Tributylamin (0,1ml, 0,42mmol) và tributylamoni pyrophosphat (0,8 ml dung dịch 0,5M trong DMF, 0,4mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy thêm 45 phút và làm mát. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng trietylamoni bicacbonat (0,5M, 5ml). Các dung môi được loại bỏ theo phương pháp làm bay hơi kiểu quay và hỗn hợp thô còn lại được hòa tan trong 2ml nước. Sản phẩm được tinh chế bằng cách sử dụng cột Sephadex DEAE A-25 với gradien tuyến tính 0M đến 1M trietylamoni bicacbonat. Sản phẩm chứa các phân đoạn được gom và cô để tạo ra hợp chất theo ví dụ 6 (TP1), mà sau đó được hòa tan trong 1ml nước để tạo ra dung dịch 10mM.

MS m/z = 532,0 [M-1]

Thời gian lưu sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion: 12,015 phút; Cột: DNAPac PA-100 4 x 250mm SN

Dung môi A: milliQ nước; Dung môi B: 0,5M tetraetylamoni bromua; chương trình gradien dung môi: cân bằng bằng cách sử dụng 100% A trong thời gian 10 phút, sau đó tăng từ 0% đến 80% B trong thời gian 14 phút; lưu tốc: 1ml/phút.



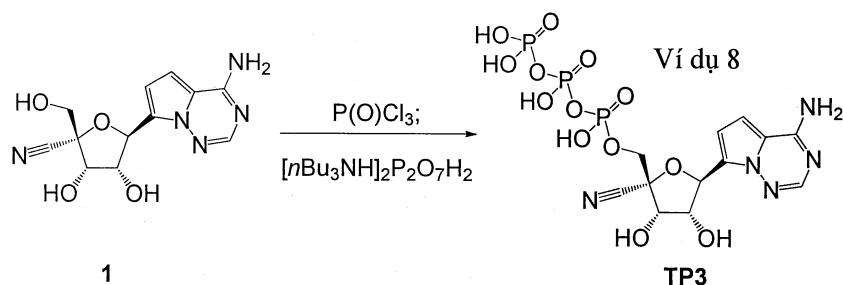
Ví dụ 7 (còn được gọi là TP2) - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-etylnyl-4-fluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

Hợp chất theo Ví dụ 2 (16,0mg, 0,055mmol) được làm khô trong bình trong chân không qua đêm. Trimetylphosphat (0,5ml) và 1,8-bis(dimethylamino)naphthalen (28mg, 0,13mmol) được bổ sung vào bình này và dung dịch được để khuấy trong khí quyển N₂ được làm mát bằng bể nước đá/nước. Phospho oxyclorea (11μl, 0,12mmol) pha loãng được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời gian 4 giờ và làm mát. Tributylamin (0,11ml, 0,42mmol) và tributylamoni pyrophosphat (0,9 ml dung dịch 0,5M trong DMF, 0,45mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy thêm 45 phút và làm mát. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng triethylamoni bicacbonat (0,5M, 5ml). Các dung môi được loại bỏ theo phương pháp làm bay hơi kiểu quay và hỗn hợp thô còn lại được hòa tan trong 2ml nước. Sản phẩm được tinh chế bằng cách sử dụng cột Sephadex DEAE A-25 với gradien tuyến tính 0M đến 1M triethylamoni bicacbonat. Sản phẩm chứa các phân đoạn được gom và cô để tạo ra hợp chất theo ví dụ 7 (TP2), mà sau đó được hòa tan trong 1,4ml nước để tạo ra dung dịch 10mM.

MS m/z = 531,0 [M-1]

Thời gian lưu sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion: 19,829 phút; Cột: DNAPac PA-100 4 x 250mm SN

Dung môi A: milliQ nước; Dung môi B: 0,5M tetraethylamoni bromua; chương trình gradien dung môi : cân bằng bằng cách sử dụng 100% A trong thời gian 10 phút, sau đó tăng từ 0% đến 80% B trong 14 phút; lưu tốc: 1ml/phút



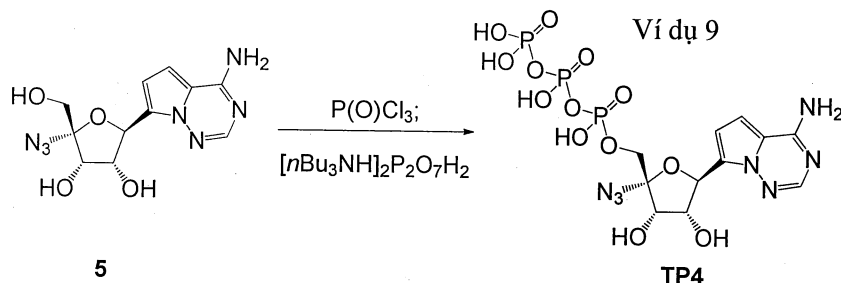
Ví dụ 8 (TP3) - ((2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-xyano-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

POCl_3 (45mg, 0,29mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất theo Ví dụ 1 (5,0mg, 0,017mmol) trong $\text{PO}(\text{OMe})_3$ (0,6ml) ở 0°C . Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 10 giờ, tại thời điểm đó sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion thể hiện mức độ chuyển hóa khoảng 50%. Dung dịch chứa các muối pyrophosphat tributylamin (250mg) trong ACN (0,6ml) được bổ sung vào, tiếp theo tributylamin (110mg, 0,59mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 0,5 giờ, và sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion cho thấy phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M, 5ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 0,5 giờ, sau đó được cô và làm bay hơi đồng thời với nước hai lần. Cặn được hòa tan trong H_2O (5ml) và nạp vào cột trao đổi ion, rửa giải bằng H_2O , sau đó 5% đến 35% dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M)- H_2O . Sản phẩm các phân đoạn được kết hợp, cô và làm bay hơi đồng thời với H_2O . Cặn lại được tinh chế bằng cột trao đổi ion để tạo ra nguyên liệu thô. ^{31}P NMR thể hiện nguyên liệu này chứa các tạp chất, nên nguyên liệu được tinh chế lại bằng cột C-18, rửa giải bằng 0% đến 15% ACN- H_2O chứa 0,05% TEA, và các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và cô để tạo ra 3,6mg nguyên liệu, mà chứa chỉ chứa 1,5 đương lượng TEA như biểu thị theo phân tích ^1H NMR. Nguyên liệu này được hòa tan trong H_2O (1ml) và dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M, 0,1ml) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm và làm bay hơi đồng thời với H_2O hai lần trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 8 (TP3), như muối tetra-TEA.

^1H NMR (400MHz, D_2O): δ 7,78 (s, 1H), 6,85 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 6,82 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 5,51 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 4,65 – 4,55 (m, 2H), 4,20 – 4,08 (m, 2H), 3,15 – 3,00 (m, 24H), 1,18 – 1,08 (m, 36H).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ -6,25 (d, $J = 52$ Hz), -12,21 (d, $J = 52$ Hz), -22,32 (t, $J = 52$ Hz).

MS $m/z = 530,2$ [M-1], 532,1 [M+1]



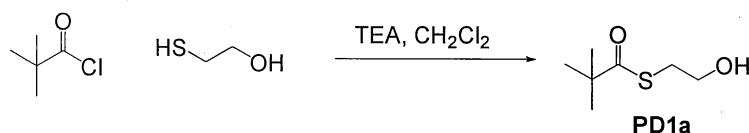
Ví dụ 9 (TP4) - ((2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-3,4-đihydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

POCl_3 (45mg, 0,29mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất theo ví dụ 5 (6,0mg, 0,019mmol) trong $\text{PO}(\text{OMe})_3$ (0,6ml) ở 0°C . Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 10 giờ, tại thời điểm đó sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion thể hiện chuyển hóa khoảng 50%. Dung dịch chứa các muối pyrophosphat tributylamin (250mg) trong ACN (0,6ml) được bổ sung vào, tiếp theo tributylamin (110mg, 0,59mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 6 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M, 5ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 0,5 giờ, sau đó được cô và làm bay hơi đồng thời với nước hai lần. Cặn được hòa tan trong H_2O (5ml) và nạp vào cột trao đổi ion, rửa giải bằng H_2O , sau đó 5% đến 35% dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M)- H_2O . Sản phẩm các phân đoạn được kết hợp, cô và làm bay hơi đồng thời với H_2O . Cặn được tinh chế lại bằng cột trao đổi ion để tạo ra nguyên liệu thô. ^{31}P NMR thể hiện nguyên liệu này chứa các tạp chất, nên nguyên liệu được tinh chế lại vẫn bằng cột trao đổi ion để tạo ra nguyên liệu thô. Nguyên liệu này được xử lý bằng NaHCO_3 (10mg) và hỗn hợp này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn rắn được hòa tan trong 0,5ml H_2O và 40 μl chứa NaOH (1N) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được tinh chế bằng cột C-18, rửa giải bằng H_2O , và các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 9 (TP4) như muối tetra-natri.

^1H NMR (400MHz, D_2O): δ 7,76 (s, 1H), 6,88 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,59 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 4,60 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,55 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 3,99 (qd, J = 11,2, 5,5 Hz, 3H).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ -8,13 (d, J = 19,8 Hz), -14,04 (d, J = 18,9 Hz), -24,00 (t, J = 19,3 Hz).

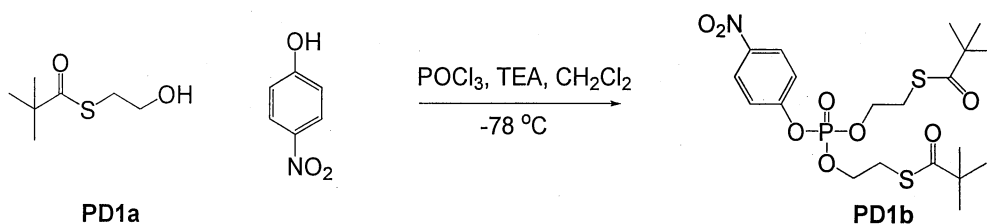
MS m/z = 546,1 [$\text{M}-1$], 547,9 [$\text{M}+1$]



Chất trung gian PD1a - S-2-hydroxyetyl 2,2-đimetylpropanthioat.

Pivalyl clorua (6,15ml, 50,0mmol) nhỏ giọt trong thời gian 30 phút được bổ sung vào dung dịch chứa 2-thioetanol (3,50ml, 50,0mmol) và triethylamin (7,02ml, 50,0mmol) trong CH_2Cl_2 , mà đã được làm lạnh đến -78°C . Hỗn hợp phản ứng để ấm lên từ từ đến nhiệt độ trong phòng và tiến triển được theo dõi theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC). Sau 30 phút, phản ứng được xác định là hoàn thành và được tôi bằng nước. Các lớp được tách và phần trong nước được rửa bằng CH_2Cl_2 . Các chất hữu cơ được kết hợp và làm khô trên natri sulfat. Các chất rắn được lọc và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel 0% đến 50% EtOAc/hexan để tạo ra chất trung gian có công thức PD1a.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4,89 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 3,49 – 3,36 (m, 2H), 2,86 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 1,14 (s, 9H).

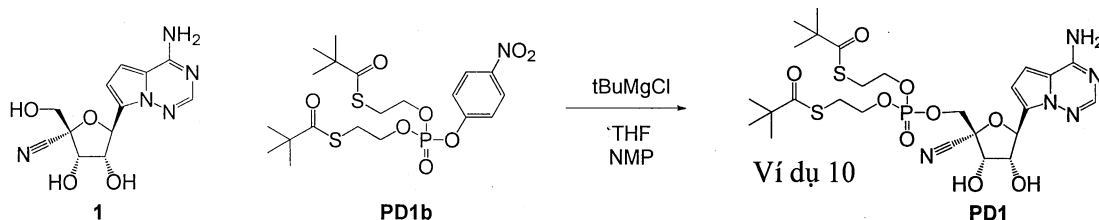


Hấp thụ phospho oxyclorua (281 μl , 3,08mmol) trong CH_2Cl_2 (5ml) và làm nguội dung dịch đến -78°C . Hấp thụ thioeste có công thức PD1a (1,00g, 6,17mmol) trong CH_2Cl_2 (5ml) và bổ sung từ từ vào dung dịch POCl_3 . Tiếp theo bổ sung TEA (891 μl ,

6,16mmol) nhỏ giọt và để khuấy lạnh trong thời gian 30 phút. Tiếp đó, làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và để khuấy trong thời gian 2 giờ. Bổ sung p-nitrophenol (428mg, 3,08mmol) một lần, tiếp theo là bổ sung từ từ TEA (449 μ l, 3,08mmol). Khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. TLC (70:30 Hexan/EtOAc) chỉ thể hiện một điểm, song LC/MS có hai pic (sản phẩm và bis-p-nitrophenolat). Dung dịch này được pha loãng bằng ete và các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và được gạn. Nước cái được cô và tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel để tạo ra hỗn hợp gồm sản phẩm và bis-p-nitrophenolat. Sau đó, hỗn hợp này được tinh chế lại theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) để tạo ra chất trung gian có công thức PD1b, S,S'-2,2'-((4-nitrophenoxy)phosphoryl)bis(oxy)bis(etan-2,1-diyl) bis(2,2-đimetylpropanthioat).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,29 – 8,21 (m, 2H), 7,46 – 7,36 (m, 2H), 4,23 (br q, J = 7,7 Hz, 4H), 3,16 (br t, J = 6,7 Hz, 4H), 1,23 (s, 18H).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -7,72 (s).



Ví dụ 10 (còn được gọi là PD1) - S,S'-2,2'-((((2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f]-[1,2,4]triazin-7-yl)-2-xyano-3,4-đihydroxytetrahydrofuran-2-yl)metoxy)phosphoryl)bis(oxy)bis(etan-2,1-diyl) bis(2,2-đimetylpropanthioat).

Hợp chất theo Ví dụ 1 (6,0mg, 0,02mmol) được hòa tan trong NMP (0,1ml), và THF (0,2ml) được bổ sung vào. Tert-butyl magie clorua (dung dịch 1,0M trong THF, 0,031ml, 0,031mmol) sau đó được bổ sung vào ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon. Sau thời gian 10 phút, dung dịch chứa chất trung gian có công thức PD1b (15,7mg, 0,031mmol) trong THF (0,1ml) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến 50°C. Sau thời gian 5 giờ, cặn thu được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (cột Phenominex Synergi 4u Hydro-RR 80Å 150 x 30mm, 40% đến 100% axetonitril/nước gradien). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 10 (PD1).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,82 (s, 1H), 6,69 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,56 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H), 4,61 (br s, 2H), 4,45 – 4,32 (m, 2H), 4,22 – 4,06 (m, 4H), 3,13 (dt, $J = 11,7, 6,7$ Hz, 4H), 1,23 (s, 9H), 1,21 (s, 9H).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -2,34 (s).

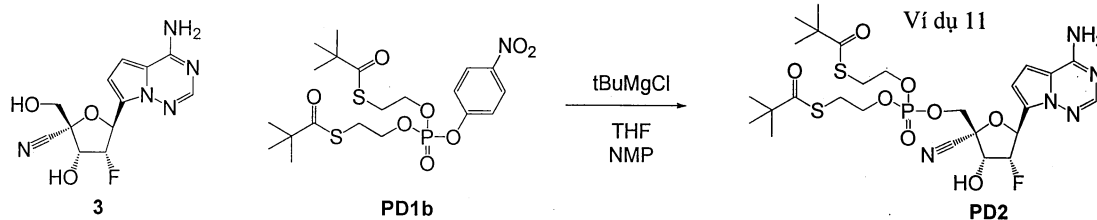
LC/MS: $t_R = 1,70$ phút, MS $m/z = 660,02$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 3,204$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA

Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Ví dụ 11 (PD2) - S,S'-2,2'-((((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-xyano-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metoxy)phosphoryl)bis(oxy)bis(etan-2,1-diyl) bis(2,2-dimethylpropanthioat).

Hợp chất theo Ví dụ 3 (10,5mg, 0,036mmol) được hòa tan trong NMP (0,1ml), và THF (0,1ml) được bổ sung vào. Sau đó, tert-butyl magie clorua (dung dịch 1,0M trong THF, 0,054ml, 0,054mmol) được bổ sung vào ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon. Sau thời gian 10 phút, dung dịch chứa chất trung gian có công thức PD1b (27,3mg, 0,054mmol) trong THF (0,1ml) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến 50°C. Sau thời gian 24 giờ, cặn thu được tinh chế theo phương pháp sắc ký

lồng cao áp điều chế (cột Phenominex Synergi 4u Hydro-RR 80Å 150 x 30mm, 40% đến 100% axetonitril/nước gradien). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 11 (PD2).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,94 (s, 1H), 6,75 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,77 (dd, $J = 27,8, 1,4$ Hz, 1H), 5,43 (ddd, $J = 55,2, 4,9, 1,3$ Hz, 1H), 4,93 (dd, $J = 21,2, 4,9$ Hz, 1H), 4,49 (dd, $J = 11,3, 7,8$ Hz, 1H), 4,40 (dd, $J = 11,3, 7,8$ Hz, 1H), 4,10 (ddt, $J = 15,9, 8,0, 6,7$ Hz, 4H), 3,16 – 3,04 (m, 4H), 1,23 (s, 9H), 1,21 (s, 9H).

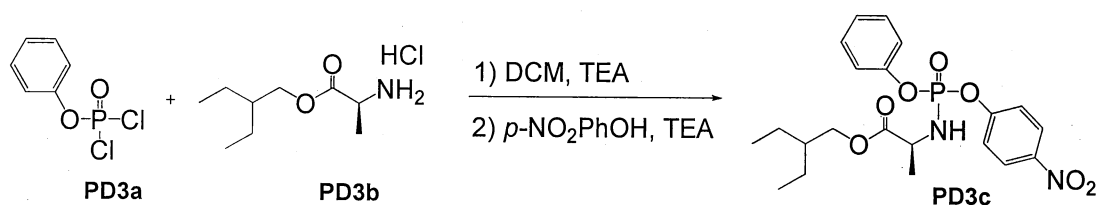
^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -2,10 (s).

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -191,64 (ddd, $J = 55,0, 27,8, 21,3$ Hz).

LC/MS: $t_R = 1,85$ phút, MS $m/z = 662,03$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradien: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 3,385$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradien: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Chất trung gian PD3c - (2S)-2-ethylbutyl 2-((4-nitrophenoxy)(phenoxy) phosphoryl-amino)propanoat.

Hòa tan phenyl điclorophosphat có công thức PD3a (1,5ml, 10mmol) trong 30ml khan DCM và khuấy trong điều kiện N_2 (khí) trong bể nước đá. Bổ sung amino este muối clorua (HCl) có công thức PD3b, (S)-2-ethylbutyl 2-aminopropanoat hydroclorua, (điều

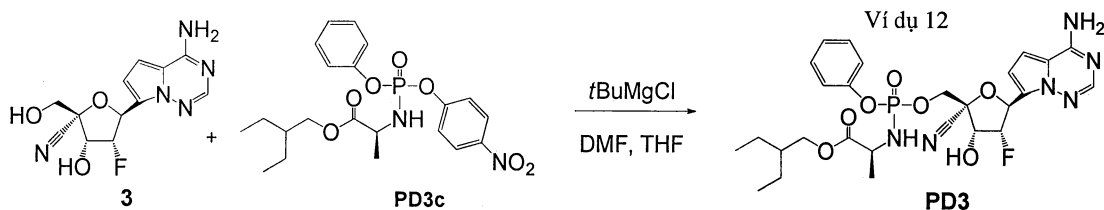
chế được theo tài liệu: Eur. J. Med. Chem, 2009, 44, 3765-3770, 2,1g, 10mmol) vào một lần. Bổ sung TEA (3ml, 22mmol) nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ ở 0°C. Bổ sung p-nitrophenol (1,4g, 10mmol) vào một lần và TEA (1,5ml, 11mmol). Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Được pha loãng bằng DCM và rửa bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Sấy khô chất hữu cơ trên Na_2SO_4 khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế bằng cột silicagel (0% đến 15% EtOAc trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức PD3c.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,23 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,41 – 7,30 (m, 4H), 7,25 – 7,19 (m, 3H), 4,10 – 4,00 (m, 3H), 3,90 - 3,83 (m, 1H), 1,55 – 1,45 (m, 1H), 1,42 – 1,31 (m, 7H), 0,87 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -3,04 (s), -3,10 (s).

LC/MS: $t_R = 2,87\text{min}$, MS $m/z = 451,1$ $[\text{M}+1]$, 449,0 $[\text{M}-1]$; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage; Phenomenex Gemini, C_{18} , 5u, 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đệm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 2,5 phút sau đó 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.

HPLC: $t_R = 4,40$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C_{18} , 5u, 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đệm B: 0,05% TFA trong axetonitril; 2% đến 98% dung dịch đệm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.



Ví dụ 12 (PD3) - (2S)-2-etylbutyl 2-((((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]-triazin-7-yl)-2-xyano-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphorylamino)propanoat.

Hòa tan hợp chất theo Ví dụ 3 (15mg, 0,051mmol) trong DMF khan (1ml) và

khuấy trong điều kiện N_2 (khí). Hòa tan p-nitrophenylphosphoamidat có công thức PD3c (35mg, 0,077mmol) trong DMF khan (0,5ml) và bổ sung vào hỗn hợp phản ứng thành một lần. tBuMgCl trong THF (1M trong THF, 77 μ l, 0,077mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 2 giờ. Bổ sung thêm p-nitrophenylphosphoamidat (35mg trong 0,5ml khan DMF) và thêm tBuMgCl (1M trong THF, 50 μ l, 0,050mmol). Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 2 giờ. Bổ sung thêm p-nitrophenylphosphoamidat (35mg trong 0,5ml khan DMF) và thêm dung dịch tBuMgCl (1M trong THF, 50 μ l, 0,050mmol). Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 16 giờ. Pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ (nước) bão hòa (3x). Rửa bằng $NaCl$ (nước) bão hòa và làm khô chất hữu cơ trên Na_2SO_4 khan. Cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế bằng cột silicagel (0% đến 5% MeOH trong DCM). Kết hợp các phân đoạn và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế bằng TFA như tác nhân cải biến để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 12(PD3).

Hệ thống sắc ký lỏng cao áp điều chế: Gilson 215 Liquid Handler; Phenomenex Gemini, C₁₈ 4u, 100 x 30,0mm

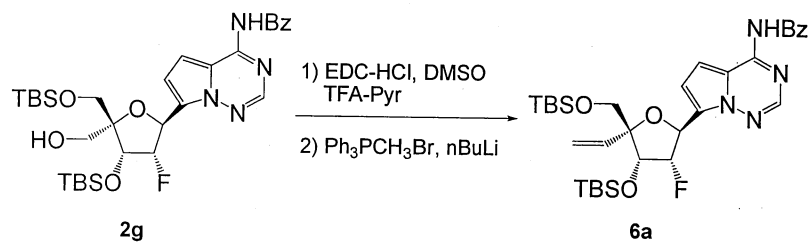
Chất đệm A: 0,1% dung dịch nước TFA ; dung dịch đệm B: 0,1% TFA trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 13 phút ở 20ml/phút.

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7,89 (s, 1H), 7,31 – 7,13 (m, 6H), 6,80 - 6,75 (m, 1H), 5,80 – 5,70 (m, 1H), 5,35 – 5,20 (m, 1H), 4,80 – 4,62 (m, 1H), 4,60 – 4,45 (m, 2H), 4,35 – 4,10 (m, 1H), 4,06 – 3,96 (m, 3H), 1,49 – 1,28 (m, 8H), 0,90 – 0,82 (m, 6H).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 2,36 (s), 2,22 (s).

HPLC: t_R = 3,00 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: Agilent 1100; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 50 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,05% dung dịch nước TFA; dung dịch đệm B: 0,05% TFA trong axetonitril; 2% đến 98% dung dịch đệm B trong thời gian 5 phút ở 2ml/phút.

LC/MS: t_R = 2,39 phút, MS m/z = 605,1 [M+1], 603,0 [M-1]; LC/Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage; Phenomenex Gemini, C₁₈, 5u, 110A, 30 x 4,6mm; dung dịch đệm A: 0,1% axit axetic trong nước; dung dịch đệm B: 0,1% axit axetic trong axetonitril; 5% đến 100% dung dịch đệm B trong 2,5 phút sau đó 100% trong 0,9 phút ở 2ml/phút.



Chất trung gian 6a - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimethylsilyloxy)-5-((tert-butylđimethylsilyloxy)metyl)-3-flo-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit

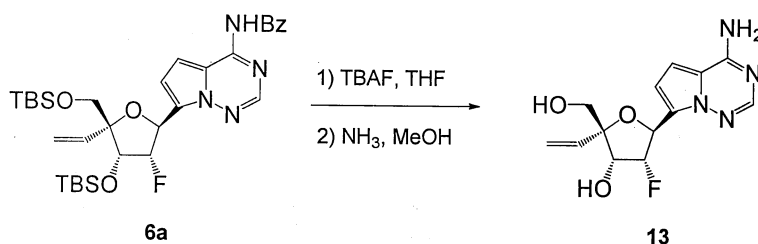
Chất trung gian có công thức 2g, N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-(tert-butylđimethylsilyloxy)-5-((tert-butylđimethylsilyloxy)metyl)-3-flo-5-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-yl)-pyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamidit, (220mg, 0,35mmol) được hòa tan trong 5ml DMSO khan và khuấy trong điều kiện N_2 (khí). Bỏ sung EDCI (100mg, 0,52mmol) và sau đó TFA-Pyridin (34mg, 0,18mmol) vào. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ. Bỏ sung thêm EDCI (100mg, 0,52mmol) và khuấy trong thời gian 1 giờ. Việc theo dõi theo phương pháp LC/MS cho thấy vẫn còn rượu nguyên liệu ban đầu. Bỏ sung thêm EDCI (100mg, 0,52mmol) vào và khuấy trong thời gian 1 giờ. Việc theo dõi theo phương pháp LC/MS cho thấy rằng phản ứng đã đạt được mức độ chuyển hóa hoàn toàn. Pha loãng bằng etyl axetat và rửa bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa (2x) và sau đó NaCl (nước) bão hòa. Sấy khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4 khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế bằng cột silicagel (0% đến 20% EtOAc trong hexan). Kết hợp các phân đoạn và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra aldehyt ở dạng rắn. Tạo huyền phù methyl triphenylphosphoni bromua (500mg, 1,40mmol) trong 10ml THF khan và khuấy ở -78°C trong khí quyển $\text{Ar}_{(\text{khí})}$. Bỏ sung nhỏ giọt dung dịch n-butyllithi 2,5M trong hexan (560 μl , 1,40mmol) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong bể nước đá trong thời gian 1 giờ để tạo ra hỗn hợp màu vàng. Hòa tan aldehyt điều chế được như trên trong 5ml THF khan và bỏ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng. Loại bỏ bể nước đá và cho phép phản ứng được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bỏ sung dung dịch nước NH_4Cl bão hòa vào và chiết bằng etyl axetat. Rửa phần chiết hữu cơ bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa và sau đó NaCl (nước) bão hòa vào. Làm khô chất hữu cơ trên Na_2SO_4 khan và cô trong điều kiện áp

suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế bằng cột silicagel (0% đến 20% EtOAc trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 6a.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,22 (br s, 1H), 8,03 (br s, 2H), 7,58 (dt, $J = 40,4, 7,4$ Hz, 3H), 7,12 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,01 (dd, $J = 17,5, 10,9$ Hz, 1H), 5,58 (d, $J = 22,8$ Hz, 1H), 5,46 (dd, $J = 17,5, 2,1$ Hz, 1H), 5,25 (dd, $J = 11,0, 2,0$ Hz, 1H), 5,14 (ddd, $J = 55,4, 4,9, 2,7$ Hz, 1H), 4,61 (dd, $J = 20,8, 4,8$ Hz, 1H), 3,63 – 3,40 (m, 2H), 0,89 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,09 (d, $J = 8,4$ Hz, 6H), 0,00 (d, $J = 14,1$ Hz, 6H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -191,86 (d, $J = 56,8$ Hz).

MS $m/z = 627,3$ $[M+1]$.



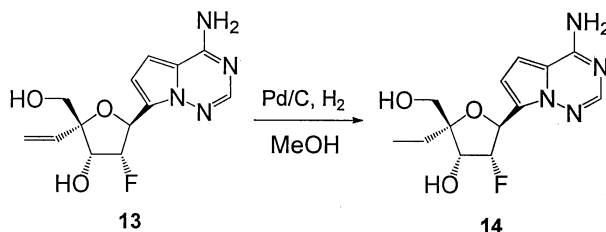
Ví dụ 13 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-2-vinyltetrahydrofuran-3-ol

Chất trung gian có công thức 6a (146mg, 0,23mmol) được hòa tan vào THF (10ml) và dung dịch thu được được khuấy trong bể nước đá. Bổ sung dung dịch TBAF 1M trong THF (700 μ l, 0,70mmol) vào và khuấy trong thời gian 2 giờ. Pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng $\text{NaCl}_{(\text{nước})}$ bão hòa (5x). Làm khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4 khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan trong 7M amoniac trong MeOH (7ml) và khuấy trong thời gian 18 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế C_{18} với TFA làm tác nhân cải biến. Kết hợp các phân đoạn và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan trong $\text{NaHCO}_{3(\text{nước})}$ và tinh chế lại theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế trong điều kiện trung tính. Kết hợp các phân đoạn và được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 13.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,54 (s, 1H), 6,62 – 6,49 (m, 2H), 5,98 – 5,79 (m, 1H), 5,55 – 5,36 (m, 2H), 5,31 (d, J = 11,1 Hz, 1H), 5,11 (ddd, J = 54,8, 5,2, 2,9 Hz, 1H), 4,42 (dd, J = 20,6, 4,8 Hz, 1H), 3,62 – 3,43 (m, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -193,23 (dd, J = 54,7, 44,2 Hz).

MS m/z = 295,2 [$\text{M}+1$]



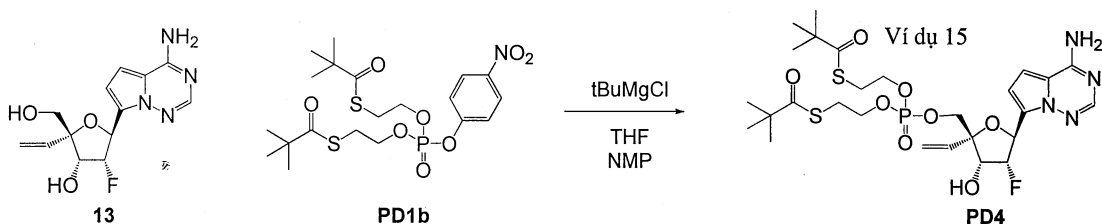
Ví dụ 14 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-etyl-4-fluoro-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol

Hợp chất theo Ví dụ 13 (5mg, 0,017mmol) được hòa tan vào trong metanol (2ml). Sau đó, chất xúc tác 10% Pd/C Degussa (2mg) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được khuấy trong khí quyển của khí hydro. Sau 40 phút, hỗn hợp thu được lọc để loại bỏ Pd/C và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được hòa tan trong nước và được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 14.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,67 (s, 1H), 6,79 – 6,55 (m, 2H), 5,54 – 5,12 (m, 2H), 4,46 (dd, J = 15,1, 5,5 Hz, 1H), 3,65 – 3,44 (m, 2H), 1,89 – 1,44 (m, 2H), 0,84 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -197,62 (ddd, J = 54,5, 20,6, 15,0 Hz).

MS m/z = 297,3 [$\text{M}+1$].



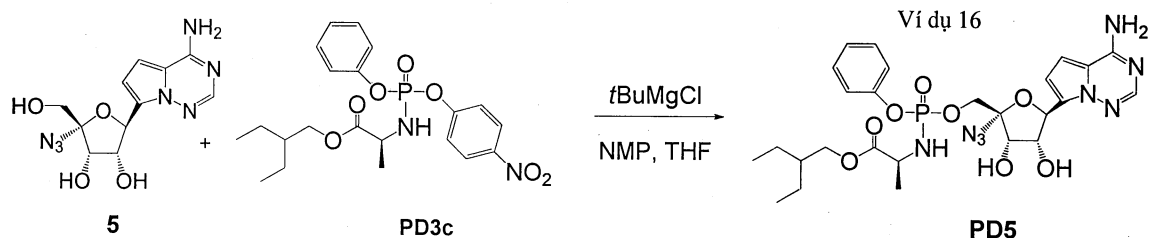
Ví dụ 15 (PD4) - S,S'-2,2'-((((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-flo-3-hydroxy-2-vinyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)phosphoryl)bis(oxy)bis(etan-2,1-diyl) bis(2,2-dimetylpropanthioat)

Hợp chất theo Ví dụ 13 (5mg, 0,017mmol) được hòa tan vào DMF khan (0,5ml). Bổ sung p-nitro-phenonat (13mg, 0,026mmol) vào một lần. Bổ sung nhỏ giọt 1M t-butylmagie clorua trong THF (25μl, 0,026mmol) vào. Hỗn hợp được khuấy trong thời gian 1 giờ. Làm ấm đến 50°C và khuấy trong thời gian 2 giờ. Bổ sung thêm p-nitro-phenonat (13mg, 0,026mmol) vào và khuấy trong thời gian 2 giờ. Bổ sung thêm 1M t-butylmagie clorua trong THF (25μl, 0,026mmol) vào và khuấy trong thời gian 16 giờ ở 50°C. Làm nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được tinh chế một cách trực tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế cột và rửa giải bằng Gradient tuyến tính 0% đến 100% ACN trong nước để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 15 (PD4).

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,84 (s, 1H), 6,92 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,10 (dd, $J = 17,4, 10,9$ Hz, 1H), 5,67 (dd, $J = 5,8, 1,9$ Hz, 1H), 5,61 (s, 1H), 5,45 – 5,35 (m, 1H), 5,15 (ddd, $J = 55,6, 5,0, 2,2$ Hz, 1H), 4,65 (dd, $J = 22,5, 5,1$ Hz, 1H), 4,13 (dd, $J = 11,1, 5,2$ Hz, 1H), 4,08 – 3,95 (m, 5H), 3,06 (dd, $J = 7,0, 6,1$ Hz, 4H), 1,21 (s, 9H), 1,18 (s, 9H).

^{19}F NMR (376 MHz, CD_3OD) δ 192,99 (td, $J = 55,7, 23,6$ Hz).

MS $m/z = 663,0$ [$M+1$].



Ví dụ 16 (PD5) - (2S)-2-etylbutyl 2-((((2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

Hợp chất theo Ví dụ 5 (5mg, 0,016mmol) được hòa tan trong khan N-metyl-2-pyrrolidon (0,2ml) và THF (0,1ml) được bổ sung trong khí quyển argon. Sau đó, tert-butyl

magie clorua (1M trong THF, 24 μ l, 0,024mmol) được bổ sung vào ở nhiệt độ trong phòng, và chất rắn màu trắng kết tủa. Sau 5 phút, dung dịch chứa p-nitrophenylphosphoamidat có công thức PD3c (15mg, 0,032mmol) trong THF (0,1ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng thành một lần, và hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến 50°C. Sau 3,5 giờ, hỗn hợp phản ứng được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 18 giờ. Sau đó, p-nitrophenylphosphoamidat có công thức PD3c (50mg, 0,111mmol) và tert-butyl magie clorua (1M trong THF, 24 μ l, 0,024mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 5 ngày nữa. Sau đó, cặn thu được được tinh chế một cách trực tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (Phenominex Synergi 4u Hydro-RR 80Å cột 150 x 30mm, 40% đến 100% axetonitril/nước gradien). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo ví dụ 16 (PD5) (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ 2:1).

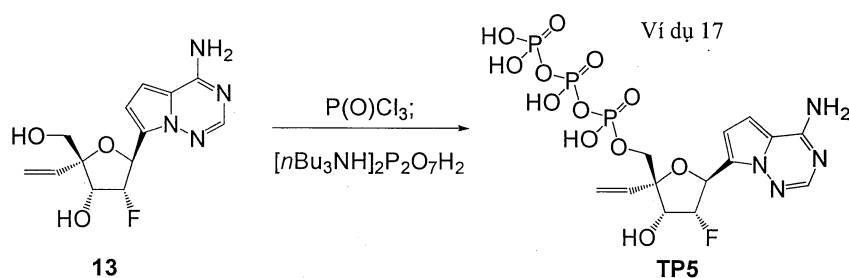
^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,88 (br s, 1H), 7,33 – 7,22 (br m, 2H), 7,22 – 7,10 (br m, 3H), 6,69 (br d, J = 4,4 Hz, 1H), 6,61 (br d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,64 – 5,56 (m, 1H), 4,54 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 4,50 – 4,20 (m, 3H), 4,11 – 3,94 (m, 3H), 3,90 – 3,76 (m, 1H), 1,49 (s, J = 6,2 Hz, 1H), 1,40 – 1,24 (m, 7H), 0,86 (t, J = 7,4 Hz, 6H).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 2,68 (s), 2,56 (s).

LC/MS: t_R = 1,70 phút, MS m/z = 619,09 $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC.

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradien: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R = 3,010 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradien: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Ví dụ 17 (TP5) - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-2-vinyltetrahydrofuran-2-yl)methyl tetrahydrogen triphosphat.

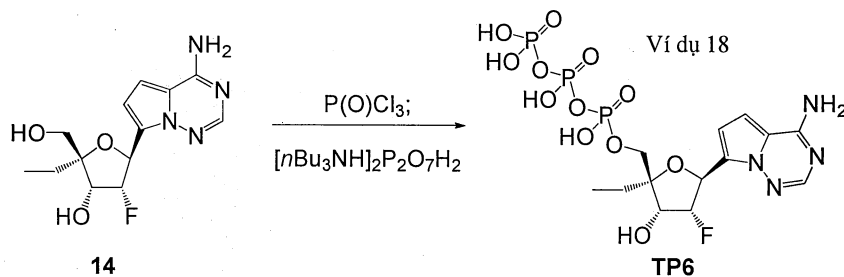
POCl_3 (50mg, 0,32mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất theo ví dụ 13 (6,0mg, 0,020mmol) trong $\text{PO}(\text{OMe})_3$ (0,6ml) ở 0°C . Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 6 giờ, tại thời điểm đó sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion thể hiện chuyển hóa khoảng 90%. Dung dịch chứa các muối pyrophosphat tributylamin (250mg) trong ACN (0,6ml) được bổ sung vào, tiếp theo là tributylamin (110mg, 0,59mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M, 5ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 0,5 giờ, sau đó được cô và làm bay hơi đồng thời với nước hai lần. Cặn được hòa tan trong H_2O (5ml) và nạp vào cột trao đổi ion, rửa giải bằng H_2O , tiếp theo là dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M)- H_2O 5% đến 35%. Sản phẩm các phân đoạn được kết hợp, cô và làm bay hơi đồng thời với H_2O . Cặn rắn được hòa tan trong 3ml H_2O và 100 μl NaOH (1N) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được tinh chế bằng cột C-18, rửa giải bằng H_2O , và các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 17 (TP5) như muối tetra-natri.

^1H NMR (400MHz, D_2O): δ 7,74 (s, 1H), 6,89 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,81 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,00 (dd, $J = 17,4, 11,1$ Hz, 1H), 5,72 (d, $J = 23,3$ Hz, 1H), 5,49 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 5,32 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H), 5,14 (dd, $J = 54,0, 4,6$ Hz, 1H), 4,72 (dd, $J = 23,7, 4,5$ Hz, 1H), 4,09 (dd, $J = 11,3, 5,8$ Hz, 1H), 3,79 (dd, $J = 11,6, 3,8$ Hz, 1H).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ -8,38 (d, $J = 20,5$ Hz), -13,67 (d, $J = 19,3$ Hz), -24,20 (t, $J = 19,9$ Hz).

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -194,58 (dt, $J = 55,0, 23,8$ Hz).

MS m/z = 533,0 [M-1], 535,0 [M+1].



Ví dụ 18 (TP6) - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-ethyl-4-fluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

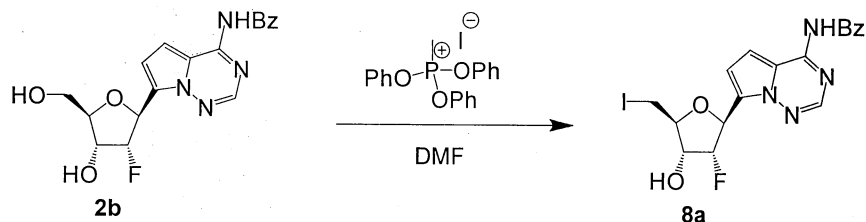
POCl_3 (45mg, 0,30mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất theo ví dụ 14 (5,0mg, 0,017mmol) trong $\text{PO}(\text{OMe})_3$ (0,6ml) ở 0°C . Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 6 giờ, tại thời điểm đó sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion thể hiện chuyển hóa khoảng 90%. Dung dịch chứa các muối pyrophosphat tributylamin (250mg) trong ACN (0,6ml) được bổ sung vào, tiếp theo là tributylamin (110mg, 0,59mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0°C trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M, 5ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 0,5 giờ, sau đó được cô và làm bay hơi đồng thời với nước hai lần. Cặn được hòa tan trong H_2O (5ml) và nạp vào cột trao đổi ion, rửa giải bằng H_2O , sau đó là dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat (1M)- H_2O 5% đến 35%. Các phân đoạn sản phẩm được kết hợp, cô và làm bay hơi đồng thời với H_2O . Cặn rắn được hòa tan trong 3ml H_2O và 100 μl dung dịch NaOH (1N) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được tinh chế bằng cột C-18, rửa giải bằng H_2O , và các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 18 (TP6) như muối tetra-natri.

^1H NMR (400MHz, D_2O): δ 7,73 (s, 1H), 6,86 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,80 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,60 (dd, J = 21,9, 3,5 Hz, 1H), 5,23 (dt, J = 55,2, 4,2 Hz, 1H), 4,65 (dd, J = 20,6, 5,3 Hz, 1H), 4,08 – 3,84 (m, 3H), 1,83 (dq, J = 14,4, 7,4, 6,9 Hz, 1H), 1,62 (dq, J = 15,0, 7,5 Hz, 1H), 0,87 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): -5,72 (d, J = 20,2 Hz), -10,81 (d, J = 19,3 Hz), -21,60 (t, J = 19,8 Hz).

^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -194,77 (dt, $J = 55,2, 21,2$ Hz).

MS $m/z = 535,1$ [M-1], 536,9,0 [M+1].



Chất trung gian 8a - N-(7-((2S,3R,4R,5S)-3-flo-4-hydroxy-5-(iodometyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)benzamid.

Hợp chất có công thức 2b (68mg, 0,183mmol) trong DMF (2ml), tiếp theo là methyltriphenoxyphosphoni ioduua (124mg, 0,274mmol) được bổ sung vào bình được sục khí argon. Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 5 phút khi việc chuyển hóa hoàn toàn thành sản phẩm được quan sát thấy theo LCMS. Hỗn hợp phản ứng này được tối bằng metanol và các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được phân bố giữa EtOAc và H_2O . Các chất hữu cơ được tách và rửa bằng nước muối. Chất liệu thu được được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (20% đến 100% EtOAc/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 8a.

^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8,17 (m, 3H), 7,63 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,17 – 6,96 (m, 2H), 5,74 (s, 1H), 5,60 (d, $J = 24,9$ Hz, 1H), 5,19 (ddd, $J = 54,6, 4,5, 2,1$ Hz, 1H), 4,09 – 3,92 (m, 1H), 3,72 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H), 3,63 (dd, $J = 11,0, 3,4$ Hz, 1H), 3,44 (dd, $J = 11,0, 5,9$ Hz, 1H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -194,23 (m).

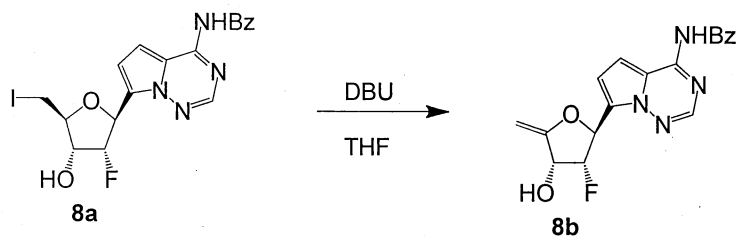
LC/MS: $t_R = 1,13$ phút, MS $m/z = 483,23$ [M+1]

Hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 8b - (3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-2-m-ethyltetrahydrofuran-3-ol.

Chất trung gian có công thức 8a (80mg, 0,166mmol) được hòa tan vào THF. DBU (0,074ml, 0,498mmol) được bổ sung vào một lần. Sau đó, phản ứng được làm nóng đến 60°C trong bể dầu trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký silicagel (0% đến 70% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 8b.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,34-8,05 (m, 3H), 7,63 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,97 – 5,82 (m, 2H), 5,39 – 5,13 (m, 1H), 4,89 – 4,69 (m, 1H), 4,38 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 4,16 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -198,14 (ddd, $J = 53,9, 24,7, 20,9$ Hz).

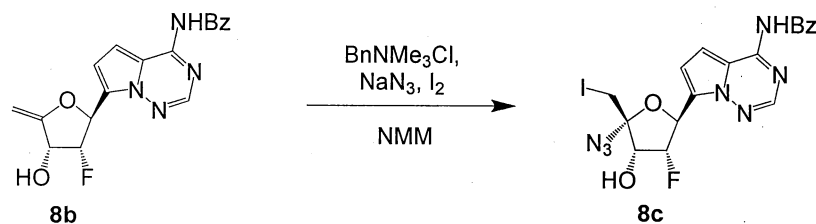
LC/MS: $t_R = 1,05$ phút, MS $m/z = 355,15$ [M+1]

Hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 8c - (2S,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-flo-2-(iodometyl)tetrahydrofuran-3-ol.

Benzyltrimetylami clorua (55mg, 0,296mmol) và natri azit (19,3mg, 0,296mmol) được hòa tan vào ACN (1ml). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm và sau đó được lọc và được bổ sung qua xi lanh vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 8b (50mg, 0,141mmol) trong THF (1ml). Sau đó, N-metyl-morpholin (0,078ml, 0,706mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa iot (65mg, 0,25mmol) trong THF (1ml). Sau 15 phút, N-axetyl xystein được bổ sung vào cho đến khi không còn quan sát thấy sự thoát khí. Tiếp đó, dung dịch nước natri thiosulfat bão hòa được bổ sung vào cho đến khi dung dịch có màu vàng nhạt. Hỗn hợp thô này được phân bố giữa EtOAc và H₂O. Các pha được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 60% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 8c.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8,31-8,05 (m, 3H), 7,63 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,53 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,14 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,34 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 5,80 (d, J = 23,7 Hz, 1H), 5,55 – 5,31 (m, 1H), 4,62 (dt, J = 21,9, 5,9 Hz, 1H), 3,78 – 3,56 (m, 2H).

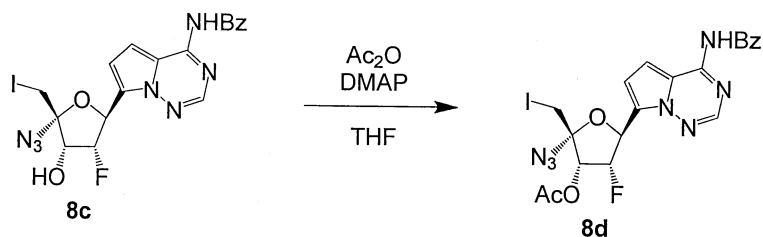
¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -194,44 (dt, J = 54,7, 22,8 Hz).

LC/MS: t_R = 1,19 phút, MS m/z = 524,09 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 8d - (2S,3R,4S,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-fluoro-2-(iodomethyl)tetrahydrofuran-3-yl axetat.

Axetic anhydrit (0,009ml, 0,092mmol), tiếp theo là DMAP (10mg, 0,082mmol) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 8c (40mg, 0,076mmol) trong THF (1ml). Sau 15 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng metanol, và hỗn hợp thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 50% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 8d.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,15-8,02 (m, 3H), 7,62 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,44 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,95 – 5,80 (m, 1H), 5,70 – 5,43 (m, 2H), 3,71 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H), 3,60 (d, $J = 11,3$ Hz, 1H), 2,25 (s, 3H).

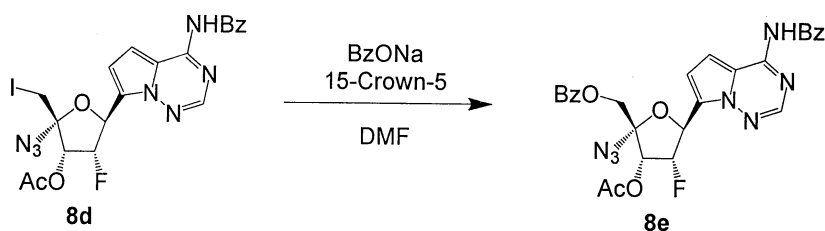
^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -192,78 (ddd, $J = 55,7, 24,6, 18,5$ Hz).

LC/MS: $t_R = 1,35$ phút, MS $m/z = 566,14$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 8e - ((2R,3R,4S,5S)-3-axetoxi-2-azido-5-(4-benzamidopyrrolo[2,1-f]-

[1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluorotetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoat.

15-Crown-5 (0,105ml, 0,531mmol) và natri benzoat (77mg, 0,531mmol) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 8d (30mg, 0,053mmol) trong DMF (2ml). Sau đó, phản ứng được làm nóng đến 105°C. Sau 30 giờ, hỗn hợp phản ứng được để đến nhiệt độ trong phòng và được phân bố giữa 5% LiCl_(nước) và EtOAc. Các pha được tách và pha nước được rửa bằng EtOAc (2 x). Các chiết phẩm hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 60% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 8e.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8,25 – 7,97 (m, 4H), 7,69 – 7,40 (m, 6H), 7,36 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 6,95 – 6,80 (m, 1H), 5,90 (d, J = 25,0 Hz, 1H), 5,65 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 5,62 – 5,48 (m, 1H), 4,69 (dd, J = 79,3, 12,0 Hz, 2H), 2,20 (s, 3H).

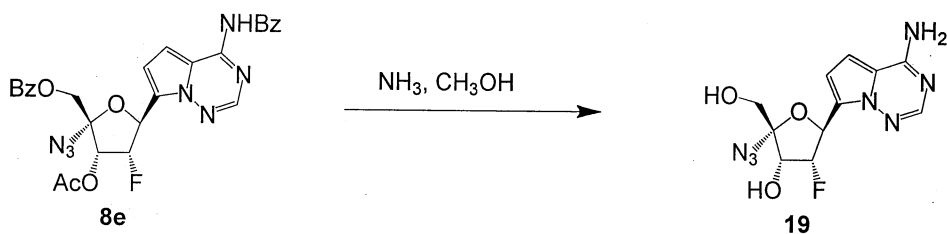
¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -192,57 (ddd, J = 53,9, 25,1, 22,0 Hz).

LC/MS: t_R = 1,45 phút, MS m/z = 560,14 [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ C18 100A, 50 x 3,00mm

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Ví dụ 19 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol.

Dung dịch NH₃ 7N trong CH₃OH (2ml) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào chất trung gian có công thức 8e (24mg, 0,043mmol). Sau 16 giờ, hỗn hợp thu được được

cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp pha đảo mà không có tác nhân cải biến axit để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 19.

^1H NMR (400MHz, Metanol- d_4) δ 7,81 (s, 1H), 6,85 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,80 (dd, $J = 24,7, 1,9$ Hz, 1H), 5,22 (ddd, $J = 55,6, 5,1, 1,9$ Hz, 1H), 4,63 (dd, $J = 22,9, 5,1$ Hz, 1H), 3,81 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 3,70 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H).

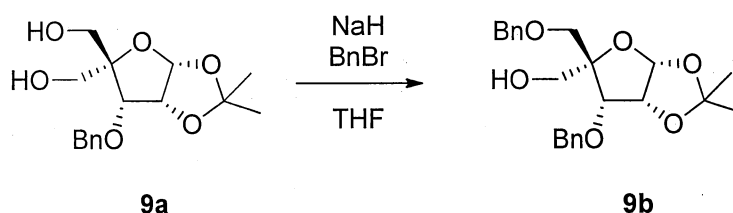
^{19}F NMR (376 MHz, Metanol- d_4) δ -195,30 (ddd, $J = 55,5, 24,6, 22,9$ Hz).

LC/MS: $t_R = 0,61$ phút, MS $m/z = 310,02$ $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ C18 100A, $50 \times 3,00\text{mm}$

Các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic

Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN.



Chất trung gian 9b - ((3aR,5R,6S,6aR)-6-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-2,2-đimetyl-tetrahydrofuro[2,3-d][1,3]đioxol-5-yl)metanol

((3aR,6S,6aR)-6-(benzyloxy)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[2,3-d][1,3]đioxol-5,5-diyl)đimethanol (có công thức 9a, mua được từ Carbosynth, 10,0g, 32,2mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa natri hydrua (60% trọng lượng, 1,55g, 38,7mmol) trong THF (100ml) ở 0°C trong khí quyển argon. Sau thời gian 10 phút, benzyl bromua (4,54ml, 38,6mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng. Sau 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa (500ml). Hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat (500ml). Sau đó, lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (400ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu không màu. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2

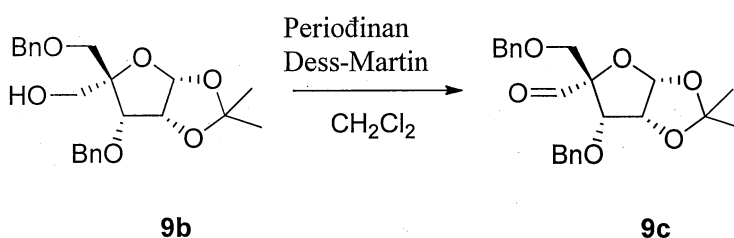
(220g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 9a (9,49g, 73%) ở dạng dầu không màu.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7,38 – 7,19 (m, 10H), 5,68 (app t, J = 3,6 Hz, 1H), 4,73 (q, J = 4,4 Hz, 1H), 4,63 (d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,49 – 4,36 (m, 3H), 4,24 (br s, 1H), 4,20 – 4,13 (m, 1H), 3,81 (d, J = 11,9 Hz, 1H), 3,56 (d, J = 11,9 Hz, 1H), 3,46 (q, J = 10,3 Hz, 2H), 1,47 (s, 3H), 1,25 (s, 3H).

LC/MS: t_R = 1,88 phút, MS m/z = 423,31 [M+Na]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2μl/phút.

HPLC: t_R = 3,79 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 40% etyl axetat trong hexan, R_f = 0,4 (UV)



Chất trung gian 9c - (3aR,5R,6S,6aR)-6-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-2,2-đimetyl-tetrahydrofuro[2,3-d][1,3]đioxol-5-carbaldehyt

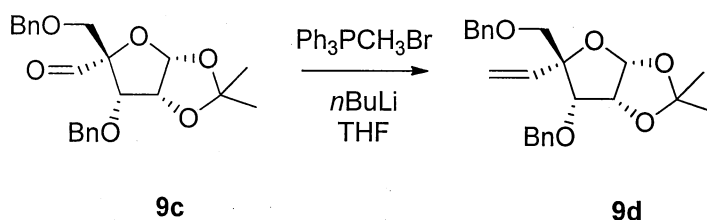
Periodinane Dess-Martin (3,1g, 7,3mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9b (1,95g, 4,87mmol) trong điclorometan (24,5ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (80g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 9c (1,94g, 100%) ở dạng dầu không màu.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9,91 (s, 1H), 7,36 – 7,11 (m, 10H), 5,84 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H), 4,71 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 4,59 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H), 4,59 – 4,58 (m, 1H), 4,52 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), 4,46 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), 4,37 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 3,68 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 3,61 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,35 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 1,99$ phút, MS $m/z = 421,25$ $[\text{M}+\text{Na}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 4,6\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở $2\mu\text{l/phút}$.

HPLC: $t_R = 4,09$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5μ C18 110A, $50 \times 4,6\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút .

TLC: chất rửa giải: 40% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,6$ (UV)



Chất trung gian 9d - (3aR,5R,6S,6aR)-6-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-2,2-đimetyl-5-vinyltetrahydrofuro[2,3-d][1,3]dioxol

2,5M n-butyllithi (6,02ml) được bổ sung vào dung dịch chứa metyltriphenylphosphoni bromua (5,38g, 15,1mmol) trong tetrahydrofuran (20ml) ở -78°C . Hỗn hợp phản ứng để ấm lên đến 0°C , và dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9c (2,00g, 5,02mmol) trong tetrahydrofuran (5ml) được bổ sung từ từ vào qua xi lanh. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng, và khuấy trong thời gian 4 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa (10ml) và phân bố giữa nước (200ml) và etyl axetat (200ml). Các lớp được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (200ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO_2 (120g SiO_2 cột Combiflash

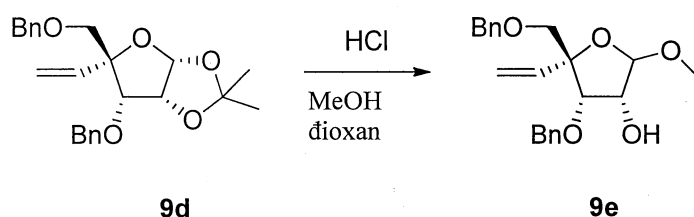
HP Gold, 0% đến 50% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 9d (1,01g, 51%) ở dạng dầu không màu.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7,42 – 7,17 (m, 10H), 6,19 (dd, $J = 17,6, 11,0$ Hz, 1H), 5,76 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 5,52 (dd, $J = 17,5, 1,9$ Hz, 1H), 5,25 (dd, $J = 11,1, 1,8$ Hz, 1H), 4,76 (d, $J = 12,3$ Hz, 1H), 4,62 – 4,55 (m, 2H), 4,52 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 4,41 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 4,25 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 3,32 (d, $J = 1,5$ Hz, 2H), 1,52 (s, 3H), 1,29 (s, 3H)

LC/MS: $t_R = 2,13$ phút, MS $m/z = 419,24$ $[\text{M}+\text{Na}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 4,6\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở $2\mu\text{l/phút}$.

HPLC: $t_R = 4,37$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5μ C18 110A, $50 \times 4,6\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút .

TLC: chất rửa giải: 50% etyl axetat trong hexan, $R_f = 0,55$ (UV)



Chất trung gian 9e - (3R,4S,5R)-4-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-2-metoxy-5-vinyltetrahydrofuran-3-ol

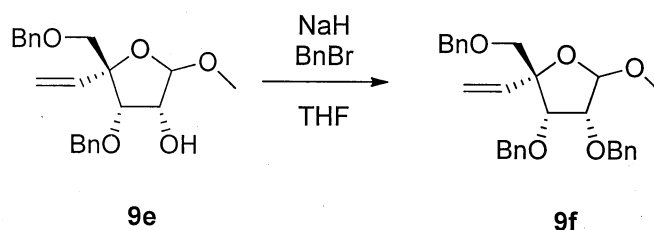
Dung dịch HCl 4M trong đioxan ($320\mu\text{l}$) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9d (1,01g, 2,55mmol) trong metanol (12,5ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 1,25 giờ, hỗn hợp phản ứng này được phân bố giữa etyl axetat (100ml) và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (100ml). Các pha được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (100ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất

giảm để tạo ra chất trung gian thô có công thức 9e (1,05g, hỗn hợp gồm các anome 1' theo tỷ lệ ~2,5:1) ở dạng dầu không màu.

LC/MS: t_R của anome chính = 2,00 phút, MS m/z = 393,22 $[M+Na]$, t_R của anome phụ = 1,98 phút, MS m/z = 393,22 $[M+Na]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R của anome chính = 4,01 phút, t_R của anome phụ = 3,955 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 25% etyl axetat trong hexan, R_f của anome chính = 0,30 (UV), R_f của anome phụ = 0,25 (UV)

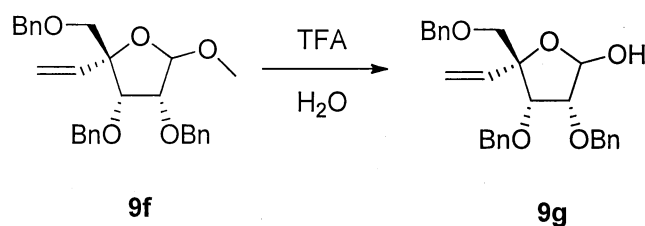


Chất trung gian 9f - (2R,3S,4R)-3,4-bis(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-5-methoxy-2-vinyltetrahydrofuran

NaH (60% trọng lượng, 130mg, 3,2mmol) được bổ sung ở dạng rắn vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9e (1,0g, 2,7mmol) trong THF (13,5ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon. Sau 15 phút, benzyl bromua (0,38ml, 3,2mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa (5ml) và phân bố giữa etyl axetat (100ml) và nước muối (100ml). Các pha được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất trung gian thô có công thức 9f (1,57g, hỗn hợp gồm các anome 1' theo tỷ lệ ~2:1) ở dạng dầu không màu.

LC/MS: t_R của anome chính = 1,88 phút, MS m/z = 483,36 $[M+Na]$, t_R của anome phụ = 1,83 phút, MS m/z = 483,36 $[M+Na]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R của anome chính = 4,83 phút, t_R của anome phụ = 4,62 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



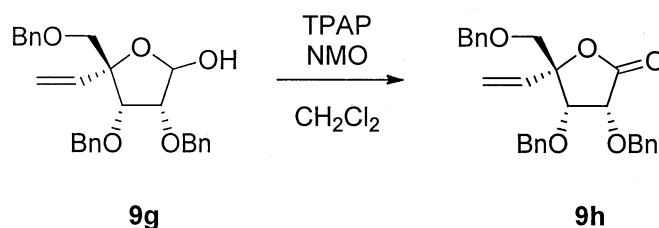
Chất trung gian 9g - (3R,4S,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-5-vinyltetrahydrofuran-2-ol

Dung dịch chứa TFA (16ml) và nước (1,6ml) được bổ sung vào chất trung gian có công thức 9f (1,5g, 3,2 mmol) ở 0°C, và hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng. Sau 9 giờ, nước (1ml) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy thêm 10 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được hòa tan vào etyl axetat (200ml) và rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (2 x 150ml) và nước muối (150ml). Lốp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (24g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp để tạo ra chất trung gian có công thức 9g (580mg) ở dạng dầu không màu mà là hỗn hợp với các tạp chất khác. Hỗn hợp này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo.

LC/MS: t_R = 3,13 phút, MS m/z = 463,88 $[M+OH]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x

4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R = 4,34 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



Chất trung gian 9h - (3R,4S,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-5-vinylđi-hydrofuran-2(3H)-on

Tetrapropylamoni peruthenat (45,7mg, 130 μ mol) và 4-metylmorpholin N-oxit (457mg, 3,89mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9g (580mg, 1,30mmol) và MS 4Å (100mg) trong DCM (6,45ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau thời gian 1 giờ, silicagel (~500mg) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và huyền phù đặc tạo thành được lọc qua nút silicagel (~1g). Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (12g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 9h (254mg, 18% sau hai bước) ở dạng dầu không màu.

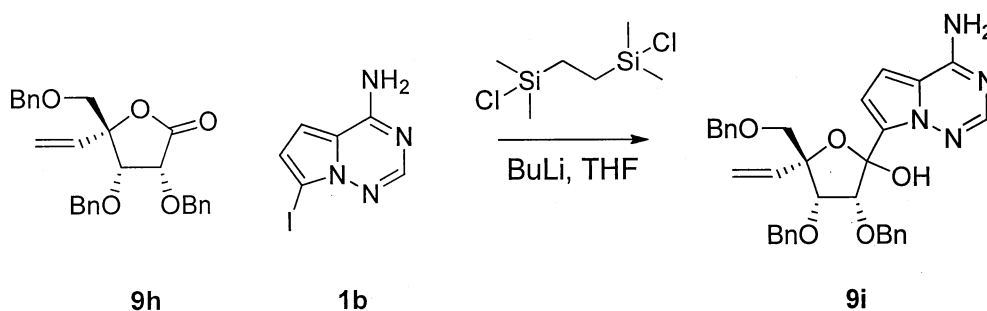
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,38 – 7,23 (m, 13H), 7,20 – 7,13 (m, 2H), 5,91 (dd, J = 17,5, 11,2 Hz, 1H), 5,49 (dd, J = 17,5, 0,9 Hz, 1H), 5,33 (dd, J = 11,2, 0,9 Hz, 1H), 4,96 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 4,74 – 4,68 (m, 2H), 4,55 – 4,47 (m, 3H), 4,39 (d, J = 11,9 Hz, 1H), 4,20 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 3,55 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 3,46 (d, J = 10,8 Hz, 1H)

LC/MS: t_R = 2,19 phút, MS m/z = 444,78 [M+H]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic;

Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R = 4,53 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: 25% etyl axetat trong hexan, R_f = 0,45 (UV)



Chất trung gian 9i - (3R,4S,5R)-2-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-bis-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-5-vinyltetrahydrofuran-2-ol

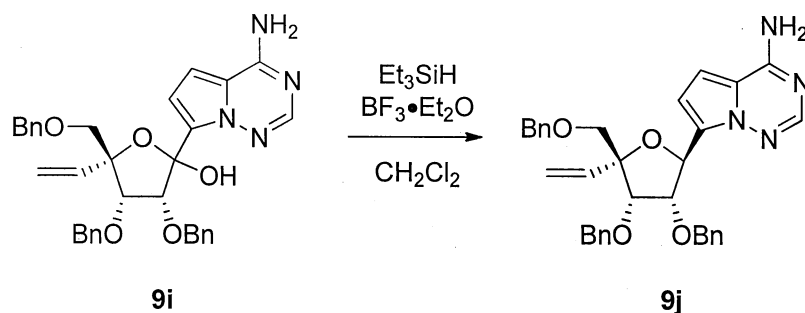
n-butyllithi (2,5M trong hexan, 1,0ml, 2,5mmol) được bổ sung nhanh vào huyền phù chứa chất trung gian có công thức 1b (0,21g, 0,81mmol) và 1,2-bis(chlorodimethylsilyl)etan (0,17g, 0,81mmol) trong THF (4ml) ở -78°C trong khí quyển argon. Sau đó, hỗn hợp thu được được chuyển qua ống thông vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 9h (0,18g, 0,41mmol) trong THF (1ml) ở -78°C trong khí quyển argon. Sau 20 phút, hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến 0°C và khuấy trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa (1ml). Hỗn hợp thu được pha loãng bằng etyl axetat (100ml) và rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (100ml) và nước muối (100ml). Lọc hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (12g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 9i (11,1mg, 5%, hỗn hợp gồm các chất đồng phân) ở dạng dầu không màu.

LC/MS: t_R = 1,97 phút, MS m/z = 579,27 [M+H]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x

4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R = 3,37 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: Etyl axetat, R_f = 0,3 (UV)



Chất trung gian 9j - 7-((2S,3S,4S,5R)-3,4-bis(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin

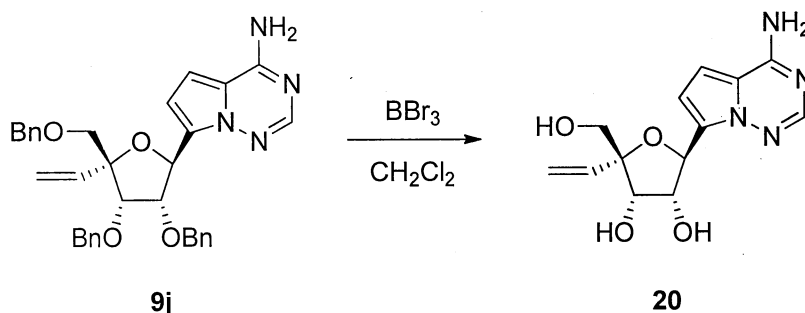
Bo triflorua dietyl eterat (0,1ml) được bổ sung từ từ ở 0°C trong khí quyển argon vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9i (11,0mg, 19,0 μ mol) và triethylsilan (0,5ml) trong DCM (1ml). Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được pha loãng từ từ bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (10ml), và hỗn hợp thu được được chiết bằng etyl axetat (2 x 10ml), làm khô trên natri sulfat khan, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế qua cột sắc ký SiO₂ (4g SiO₂ cột Combiflash HP Gold, 0% đến 100% etyl axetat/hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 9j (7,7mg, 72%) ở dạng màng không màu.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7,87 (s, 1H), 7,37 – 7,17 (m, 15H), 6,73 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 6,51 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 6,23 (dd, J = 17,5, 10,9 Hz, 1H), 5,70 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 5,59 (dd, J = 17,5, 1,8 Hz, 1H), 5,32 (dd, J = 10,9, 1,7 Hz, 1H), 4,72 – 4,56 (m, 4H), 4,49 (d, J = 11,9 Hz, 2H), 4,43 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 4,25 (dd, J = 5,6, 4,0 Hz, 1H), 3,56 (s, 2H).

LC/MS: $t_R = 2,32$ phút, MS $m/z = 563,33$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: $t_R = 3,51$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

TLC: chất rửa giải: Etyl axetat, $R_f = 0,40$ (UV)



Ví dụ 20 - (2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-(hydroxymethyl)-2-vinyltetrahydrofuran-3,4-di-ol

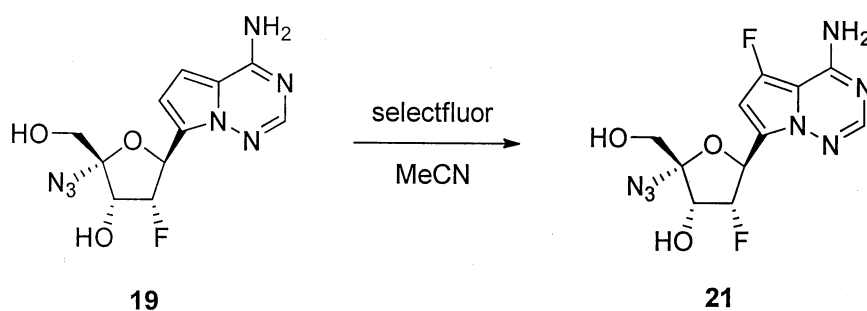
Boron tribromua (1M, 0,06ml, 60 μ mol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 9j (7,7mg, 13,7 μ mol) trong điclorometan (1ml) ở -78°C trong khí quyển argon. Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến 0°C , và khuấy thêm 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến -78°C và được tối bằng dung dịch metanol/pyridin theo tỷ lệ 2:1 (1,5ml). Hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (Phenomenex Synergi 4u Hydro-RR 80Å cột 150 x 30mm, 0% đến 100% axetonitril/nước gradient) để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 20 (0,5mg, 13%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,78 (s, 1H), 6,88 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,76 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,02 (dd, $J = 17,4, 11,0$ Hz, 1H), 5,47 (dd, $J = 17,4, 2,0$ Hz, 1H), 5,23 (dd, $J = 10,9,$

2,1 Hz, 1H), 5,15 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,72 (dd, $J = 8,2, 5,7$ Hz, 1H), 4,34 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 3,60 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 3,49 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H)

LC/MS: $t_R = 0,84$ phút, MS $m/z = 293,19$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 1,5 phút 2% đến 100% ACN, 1,5 phút đến 2,2 phút 100% ACN, 2,2 phút đến 2,4 phút 100% đến 2% ACN, 2,4 phút đến 2,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút

HPLC: $t_R = 2,181$ phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



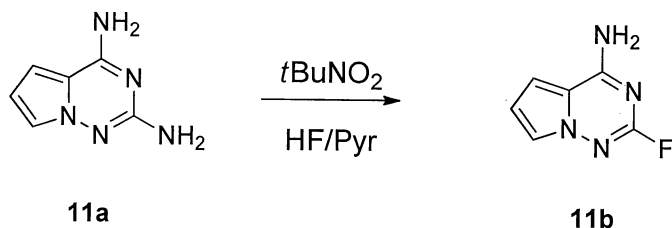
Ví dụ 21 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-5-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-fluoro-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol

Hợp chất theo Ví dụ 19 (237mg, 0,766mmol) và selectfluor (407mg, 1,15mmol) được tạo huyền phù trong axetonitril (5ml), và AcOH (0,2ml) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút, và sau đó được trung hòa bằng dung dịch natri bicacbonat và lọc để loại bỏ các chất rắn. Khi cô trong chân không, cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế (axetonitril 0% đến 30% trong nước) để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 21 (27mg, 11%) ở dạng rắn màu trắng đục.

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,73 (s, 1H), 6,63 (s, 1H), 5,80 (dd, $J = 23,9, 1,7$ Hz, 1H), 5,16 (ddd, $J = 55,3, 5,0, 1,7$ Hz, 1H), 4,56 (dd, $J = 23,5, 5,0$ Hz, 1H), 3,94 – 3,60 (m, 2H)

^{19}F NMR (376 MHz, CD_3OD) δ -161,76 (s), -195,42 (d, $J = 55,4$ Hz)

MS $m/z = 328$ $[M+H]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet



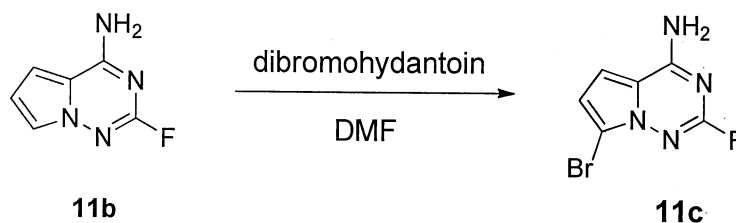
Chất trung gian 11b -2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin.

Chất trung gian có công thức 11a (2,0g, 13,4mmol) được nạp vào bình polyTube. Sau đó, bình phản ứng được đặt trong bể nước đá và cả 70% HF/Pyr (18ml) và pyridin (9ml) được bổ sung liên tục. Ngay lập tức sau khi bổ sung pyridin, $t\text{BuNO}_2$ (2,07ml, 17,43mmol) được bổ sung từ từ vào trong thời gian 20 phút. Dung dịch chuyển từ màu nâu sang màu đen có tỏa nhiệt và thoát khí. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 20 phút nữa, và tiếp đó hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được phân bố giữa etyl axetat và nước. Các chất hữu cơ được tách và phần trong nước được rửa bằng etyl axetat ba lần. Các chất hữu cơ được kết hợp và rửa bằng nước muối. Thô được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (50% đến 100% EtOAc/ Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 11b (1,68g, 82%) ở dạng rắn màu nâu vàng nhạt.

^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8,49 – 8,09 (m, 2H), 7,58 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 4,5$, 1H), 6,59 (d, $J = 4,5$, 1H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -73,42 (s).

LC/MS: $t_R = 1,03$ phút, MS $m/z = 153,08$ $[M+H]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



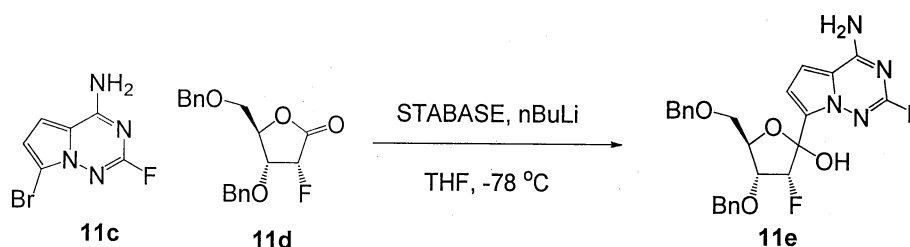
Chất trung gian 11c - 7-bromo-2-flopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin.

Dung dịch chứa hợp chất có công thức 11b (3,36g, 22,1mmol) trong DMF (50ml) được làm lạnh đến 0°C trong bể nước đá. Dung dịch chứa 1,3-đibromo-5,5-đimethylhydantoin (3,16g, 11,0mmol) trong DMF (50ml) được bổ sung nhỏ giọt vào bằng phễu cấp liệu trong thời gian 40 phút. Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (nước) bão hòa và phần thô được phân bố giữa EtOAc và 5% LiCl (nước). Các chất hữu cơ được chiết bằng 5% LiCl (nước) (4 x), tiếp theo là nước muối. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được xử lý bằng siêu âm với CH_2Cl_2 , và các chất rắn được gom bằng cách lọc, và sấy khô trong chân không cao để tạo ra chất trung gian có công thức 11c (3,93g, 77%) ở dạng rắn màu vàng.

^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8,49-8,44 (m, 2H), 7,08 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,76 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) δ -71,45 (s).

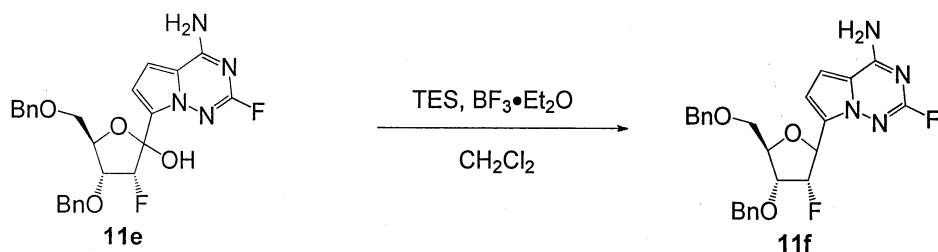
LC/MS: $t_R = 1,22$ phút, MS $m/z = 232,98$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 11e - (3R,4R,5R)-2-(4-amino-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-3-flotetrahydrofuran-2-ol.

1,2-bis(clodimetylsilyl)etan (STABASE, 1,96g, 9,08mmol) được bổ sung một lần vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 11c (2,09g, 9,08mmol) trong THF (30ml), và hỗn hợp thu được được để khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 1 giờ. Sau đó, phản ứng được làm lạnh đến -78°C bằng cách sử dụng bể nước đá khô với metanol. nBuLi (2,5M trong hexan, 10,9ml, 27,2mmol) được bổ sung theo cách nhằm duy trì nhiệt độ bên trong ở -65°C . Tiếp đó, dung dịch chứa chất trung gian có công thức 11d (điều chế được theo WO2012012776, 2,5g, 7,5mmol) trong THF (25ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trong thời gian 1 phút. Sau 5 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng axit axetic và được để đến nhiệt độ môi trường. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và cặn được đưa vào etyl axetat. Các chất hữu cơ được rửa bằng nước tiếp theo là nước muối. Các lớp được tách và các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất thô có công thức 11e ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân, mà được dùng cho bước tiếp theo.

LC/MS: $t_R = 1,32$ và $1,40$ phút, MS $m/z = 483,15$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 3,00\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

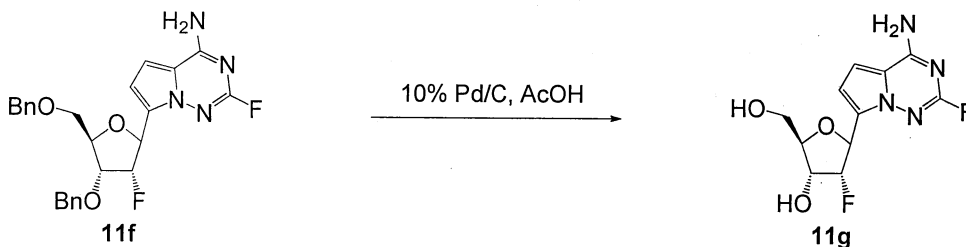


Chất trung gian 11f - 7-((2S,3S,4R,5R)-4-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)metyl)-3-flotetrahydrofuran-2-yl)-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin.

Chất trung gian có công thức 11e (1,99g, 3,72mmol) được hòa tan vào CH_2Cl_2 (80ml) và TES (4,75ml, 29,7mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến 0°C và $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1,07ml, 4,09mmol) được bổ sung từ từ vào vào.

Sau 15 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa và các lớp được tách. Lớp nước được rửa bằng CH_2Cl_2 . Các lớp hữu cơ được kết hợp và rửa bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 60% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 11f (1,12g, 64%, hỗn hợp gồm các anome 1' theo tỷ lệ 2:1).

LC/MS: $t_R = 1,55$ phút, MS $m/z = 467,47$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 3,00\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

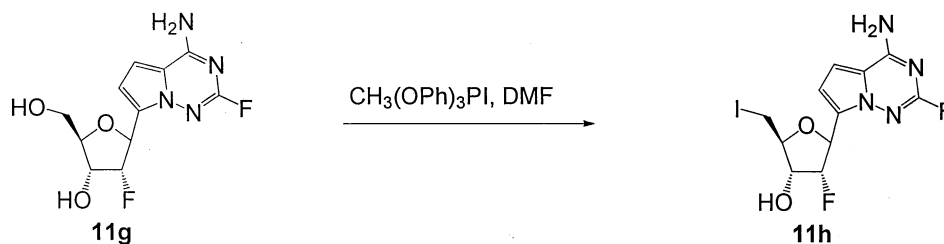


Chất trung gian 11g - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-2-flopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-flo-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol

Chất trung gian có công thức 11f (0,82g, 1,76mmol) được hòa tan trong axit axetic (25ml). Bình phản ứng này được sục argon và 10% Pd/C (468mg, 0,439mmol) được bổ sung vào. Bình này được tháo rỗng và nạp đầy lại bằng H_2 (khí) (3 x). Sau thời gian 1 giờ, bình phản ứng được sục nitơ. Hỗn hợp thu được được lọc qua đệm xelit và bánh lọc được rửa bằng CH_3OH . Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm và sau đó đồng bay hơi với etyl axetat tiếp theo là các hexan để tạo ra chất trung gian có công thức 11g (503mg, 98%, hỗn hợp gồm các anome 1' theo tỷ lệ 2:1).

LC/MS: $t_R = 0,81$ phút, MS $m/z = 286,97$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 3,00\text{mm}$; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic;

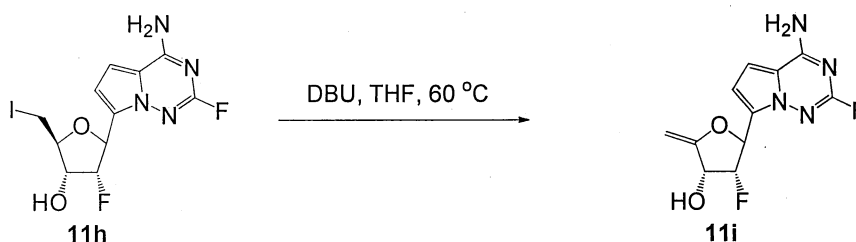
Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 11h - (2S,3R,4R,5S)-5-(4-amino-2-flopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-flo-2-(iodometyl)tetrahydrofuran-3-ol.

Dung dịch chứa hợp chất có công thức 11g (283mg, 0,989mmol) trong DMF (10ml), tiếp theo là dung dịch chứa methyl triphenoxyposphoni iđua (0,536g, 1,19mmol) trong 4ml DMF được bổ sung vào bình được sục khí argon. Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở 0°C trong thời gian 10 phút và sau đó được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ môi trường. Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (nước) bão hòa. Nguyên liệu thô được phân bố giữa EtOAc và 5% LiCl (nước). Các chất hữu cơ được tách và rửa bằng nước muối. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được đưa vào ACN và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) mà không có tác nhân cải biến axit để tạo ra chất trung gian có công thức 11h (201mg, 52%, hỗn hợp gồm các anome 1' theo tỷ lệ 2:1) ở dạng rắn màu trắng.

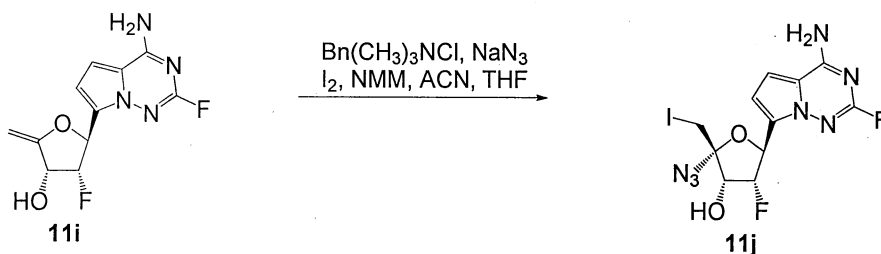
LC/MS: $t_R = 1,08$ phút, MS $m/z = 397,12$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 11i - (3R,4R,5S)-5-(4-amino-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-flo-2-metylentetrahydrofuran-3-ol.

DBU (0,403ml, 2,70mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 11h (356mg, 0,899mmol) trong THF (8ml) và hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến 60°C. Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (40% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 11i (201mg, 83%, hỗn hợp gồm các anome 1' theo tỷ lệ 2:1) ở dạng rắn màu trắng.

LC/MS: $t_R = 1,04$ phút, MS $m/z = 269,14$ [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 11j - (2S,3R,4R,5S)-5-(4-amino-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-flo-2-(iodometyl)tetrahydrofuran-3-ol

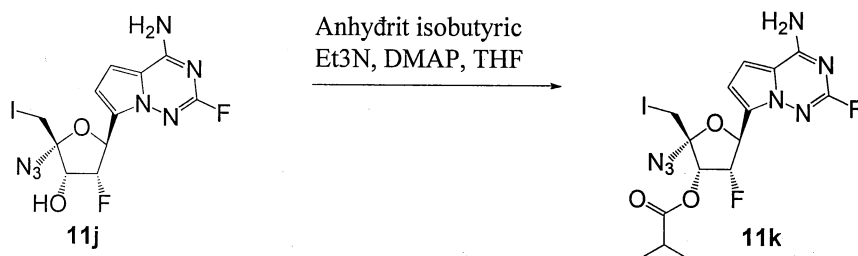
Benzyltrimetylamoni clorua (292mg, 1,57mmol) và natri azit (102mg, 1,57mmol) được hòa tan trong ACN (4ml), và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 4 giờ. Hỗn hợp này được lọc và dịch lọc được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 11i (0,201g, 0,749mmol) trong THF (4ml). NMM (0,412ml, 3,75mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa iot (0,342g, 1,35mmol) trong THF (4ml). Sau 15 phút, N-axetyl xystein được bổ sung từng phần vào cho đến khi không quan sát thấy sự thoát khí. Dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (nước) bão hòa được bổ sung cho đến khi dung dịch có màu vàng nhạt. Hỗn hợp thu được phân bố giữa nước và etyl axetat. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong

điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (20% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 11j (183mg, 56%) ở dạng chất đồng phân đơn nhất.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,44 (d, $J = 28,6$ Hz, 2H), 6,98 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,79 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,32 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H), 5,60 (dd, $J = 23,8, 2,5$ Hz, 1H), 5,36 (ddd, $J = 54,9, 5,0, 2,6$ Hz, 1H), 4,60 (ddd, $J = 21,5, 6,9, 5,0$ Hz, 1H), 3,63 (ABq, $\Delta\delta = 0,09\text{ppm}$, $J = 8\text{Hz}$, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -71,74 (s), -194,57 (ddd, $J = 54,9, 24,0, 21,7$ Hz)

LC/MS: $t_R = 1,71$ phút, MS $m/z = 437,93$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



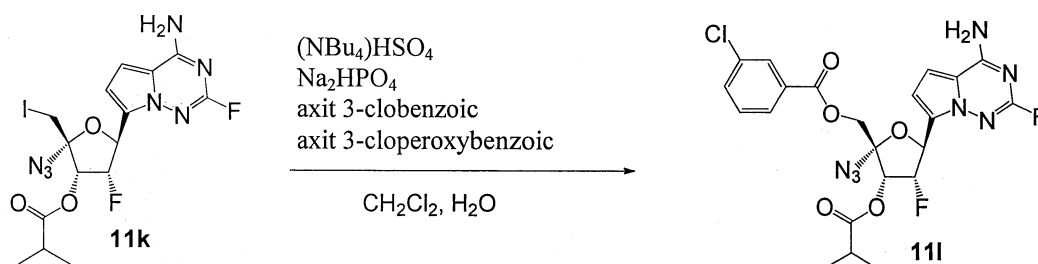
Chất trung gian 11k - (2S,3R,4S,5S)-5-(4-amino-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-flo-2-(iodometyl)tetrahydrofuran-3-yl isobutytrat.

Anhydrit isobutyric (0,083ml, 0,502mmol), TEA (0,118ml, 0,837mmol), và DMAP (10mg, 0,084mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 11j (0,183g, 0,419mmol) trong THF (10ml). Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 15 phút, và phản ứng được tối bằng CH_3OH . Hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 50% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 11k (0,198g, 93%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,48 (d, J = 30,7 Hz, 2H), 6,99 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,77 – 5,47 (m, 3H), 3,69 (ABq, $\Delta\delta$ = 0,05ppm, J = 12 Hz, 2H), 2,70 (p, J = 7,0 Hz, 1H), 1,24 – 1,05 (d, J = 7,0 Hz, 6H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -71,58 (s), -194,89 (ddd, J = 55,0, 24,3, 16,8 Hz).

LC/MS: t_R = 1,56 phút, MS m/z = 508,13 $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 11l - ((2R,3R,4S,5S)-5-(4-amino-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-flo-3-(isobutyryloxy)tetrahydrofuran-2-yl)metyl 3-clobenzoat.

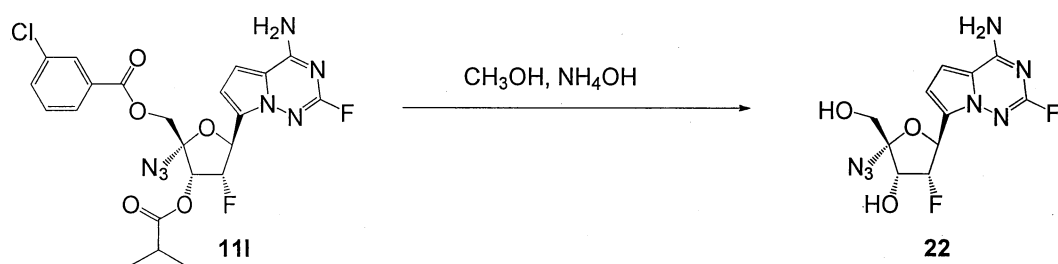
Chất trung gian có công thức 11k (0,153g, 0,302mmol) được hòa tan trong CH_2Cl_2 (10ml) và H_2O (6ml). Kali phosphat điaxit (0,138g, 0,603mmol), tetrabutylamoni bisulfat (0,210g, 0,618mmol), và axit 3-clobenzoic (0,097g, 0,618mmol) được bổ sung liên tục vào. Hỗn hợp thu được làm lạnh đến 0°C và MCPBA (0,203g, 0,905mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ môi trường và khuấy trong thời gian 16 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (nước) bão hòa, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô trong nước được pha loãng bằng ACN và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế mà không có tác nhân cải biến axit để tạo ra chất trung gian có công thức 11l (20mg, 13%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,46 (d, J = 26,4 Hz, 2H), 7,96 – 7,81 (m, 2H), 7,81 – 7,66 (m, 1H), 7,62 – 7,46 (m, 1H), 6,94 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 6,80 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,73

(s, 3H), 4,60 (ABq, $\Delta\delta = 0,08\text{ppm}$, $J = 12\text{ Hz}$, 2H), 2,66 (p, $J = 7,0\text{ Hz}$, 1H), 1,20 – 1,01 (m, 6H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) $\delta = -71,45$ (s), $-193,41$ (ddd, $J = 54,4, 25,4, 21,2\text{ Hz}$).

LC/MS: $t_R = 2,22$ phút, MS $m/z = 536,17$ [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



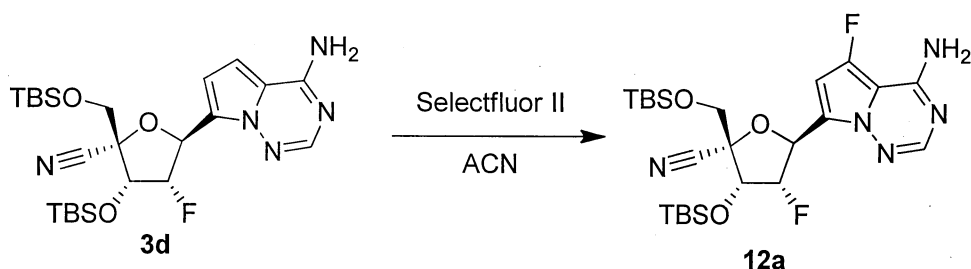
Ví dụ 22 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-2-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol

NH_4OH (1ml) đậm đặc ở nhiệt độ phòng được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 11I (22mg, 0,041mmol) trong CH_3OH (1ml). Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được pha loãng bằng H_2O tối thiểu và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế mà không có tác nhân cải biến để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 22 (10mg, 77%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,40 (d, $J = 30,9\text{ Hz}$, 2H), 6,95 (d, $J = 4,5\text{ Hz}$, 1H), 6,78 (d, $J = 4,5\text{ Hz}$, 1H), 5,89 (d, $J = 7,5\text{ Hz}$, 1H), 5,61 (dd, $J = 23,8, 2,1\text{ Hz}$, 1H), 5,44 (t, $J = 6,1\text{ Hz}$, 1H), 5,18 (ddd, $J = 55,3, 5,1, 2,2\text{ Hz}$, 1H), 4,44 (ddd, $J = 23,7, 7,5, 5,0\text{ Hz}$, 1H), 3,59 (ddd, $J = 48,5, 12,0, 6,1\text{ Hz}$, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) $\delta -71,18$ (s), $-193,48$ (dt, $J = 55,3, 23,8\text{ Hz}$).

LC/MS: $t_R = 1,13$ phút, MS $m/z = 327,86$ $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



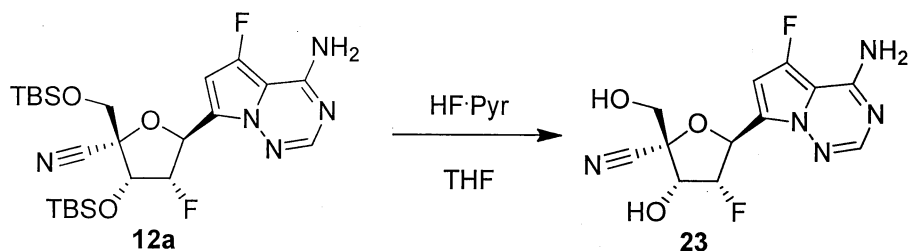
Chất trung gian 12a - (2R,3R,4S,5S)-5-(4-amino-5-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-2-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-4-flotetrahydrofuran-2-cacbonitril

Selectfluor II (52mg, 0,164mmol) bổ sung một lần vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 3d (57mg, 0,109mmol) trong ACN (3ml). Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Etyl axetat (4ml) được bổ sung vào và hỗn hợp hai pha này được khuấy kỹ trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng tiếp bằng EtOAc và dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được chiết bằng nước và sau đó nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 . Tác nhân làm khô được loại bỏ bằng cách lọc chân không và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Chất trung gian có công thức 12a (11mg, 18,7 %) phân lập được từ nguyên liệu thô đậm đặc bằng cột sắc ký trên silicagel bằng cách sử dụng dung môi dưới đây nằm trong khoảng từ: 0% EtOAc trong hexan tăng lên đến 70% EtOAc trong hexan, nhanh tăng lên đến 100% EtOAc sau khi nguyên liệu ban đầu rửa giải hết khỏi cột.

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,72 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 5,65 (dd, $J = 24,8, 2,4$ Hz, 1H), 5,38 (dq, $J = 54,4, 2$ Hz, 1H), 4,88 (dd, $J = 19,2, 4,4$ Hz, 1H), 3,96 (ABq, $\Delta\delta_{AB} = 0,141\text{ppm}$, $J = 11$ Hz, 2H), 0,99 (s, 9H), 0,86 (s, 9H), 0,21 (s, 6H), 0,07 (s, 3H), -0,02 (s, 3H).

^{19}F NMR (376 MHz, CD_3OD) δ -161,795 (s), -194,806 (ddd, J = 54,5, 19,2, 18,8 Hz).

LC/MS: thời gian lưu = 2,06 phút, MS m/z = 540,64 $[\text{M}+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS: thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



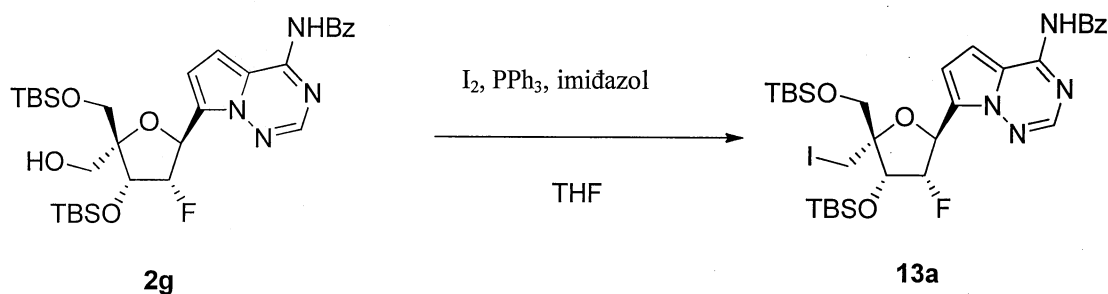
Ví dụ 23 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-5-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-carbonitril

70% HF·Pyridin trong pyridin (51 μl , 1,97mmol) ở 0°C , trong khí quyển N_2 được bổ sung vào dung dịch chứa chất trung gian có công thức 12a (29mg, 0,054mmol) trong THF (2ml) trong ống polypropylen. Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng được lấy ra khỏi bể làm lạnh bằng nước đá. Thêm 70% HF·Pyridin trong pyridin được bổ sung vào sau 3 giờ (150 μl), 5 giờ 45 phút (200 μl), và 21 giờ 15 phút (0,7ml). Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được khuấy thêm 24 giờ, tại thời điểm đó hỗn hợp phản ứng được làm nguội trong bể nước đá và sau đó được tôi bằng nước và dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Hỗn hợp này được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn được đưa vào DMF. Dung dịch /huyền phù thu được được lọc qua bộ lọc xanh (Whatman $0,45\mu\text{m}$ PTFE w/GMF). Dịch lọc được nạp vào thiết bị sắc ký lỏng cao áp và sản phẩm bán tinh khiết được tinh chế tiếp bằng cột sắc ký trên silicagel bằng cách sử dụng dung môi dưới đây nằm trong khoảng từ: 0% MeOH trong DCM tăng lên đến 20% MeOH trong DCM. Sản phẩm chứa các phân đoạn được cô và cặn được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 23 (5mg, 30%) ở dạng bột màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMF-d_7) δ 7,74 (s, 1H), 6,61 (s, 1H), 5,75 (dd, $J = 25,2, 1,6$ Hz, 1H), 5,23 (ddd, $J = 54,8, 4,8, 1,6$ Hz, 1H), 4,64 (dd, $J = 22, 4,4$ Hz, 1H), 3,90 (ABq, $\Delta\delta_{\text{AB}} = 0,151\text{ppm}$, $J = 12$ Hz, 2H) .

^{19}F NMR (376 MHz, DMF-d_7) δ -161,727 (s), -193,726 (ddd, $J = 54,5, 22,9, 21,8$ Hz).

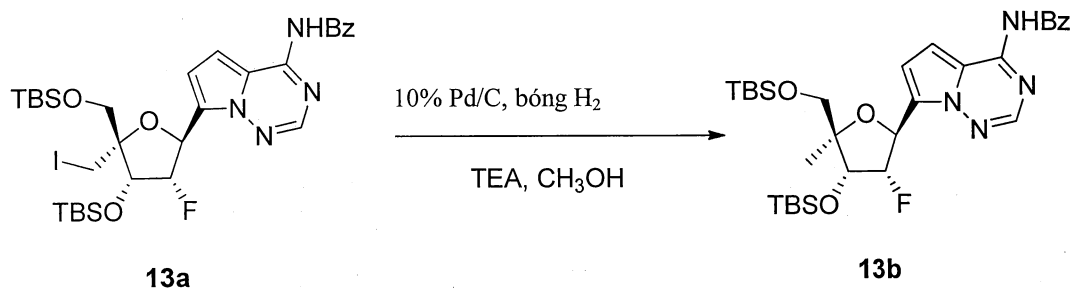
LC/MS: thời gian lưu = 0,81 phút, MS $m/z = 312,13$ $[\text{M}+1]$; LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; MS: thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,8 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3 phút 2% ACN.



Chất trung gian 13a - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-5-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-3-flo-5-(iodometyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[2,1-f]-[1,2,4]triazin-4-yl)benzamid.

Iot (253mg, 1,86mmol) ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung vào dung dịch chứa triphenylphosphin (973mg, 3,71mmol) và imidazol (252mg, 3,71mmol) trong THF (5ml). Khi hòa tan hoàn toàn iot, dung dịch chứa hợp chất có công thức 2g (650mg, 0,93mmol) trong THF (5ml) được bổ sung nhỏ giọt từ từ. Hỗn hợp thu được được khuấy ở 80°C trong thời gian 3 ngày và sau đó được cô trong chân không. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel (0% đến 50% EtOAc trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 13a (230mg, 33%) ở dạng dầu.

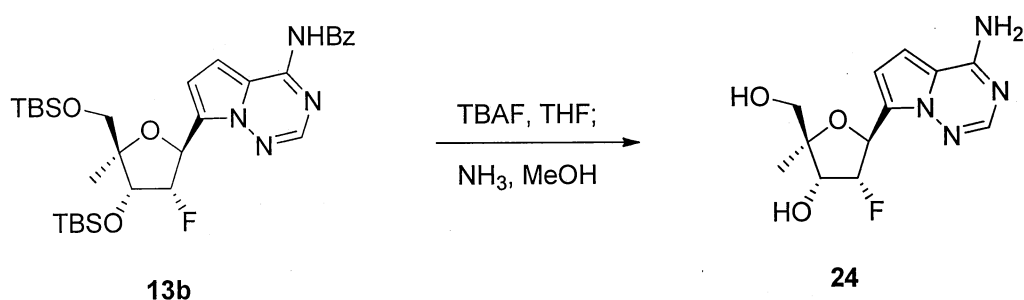
MS $m/z = 742$ $[\text{M}+\text{H}]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet.



Chất trung gian 13b - N-(7-((2S,3S,4R,5R)-4-((tert-butylđimetylsilyl)oxy)-5-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-3-flo-5-metyltetrahydrofuran-2-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]-triazin-4-yl)benzamid.

Chất trung gian có công thức 13a (200mg, 0,243mmol) được hòa tan trong metanol (10ml) và trong khí quyển nitơ, 10% Pd/C (100mg, 0,094mmol) và TEA (0,035ml, 0,243mmol) được bổ sung vào. Sau đó, hỗn hợp thu được được khuấy trong khí quyển H₂ (bóng) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 40 phút. Hỗn hợp thu được được lọc, và cô trong chân không và cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel (0% đến 40% EtOAc trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 13b (145mg, 72%) ở dạng rắn màu trắng có độ tinh khiết 75%.

MS m/z = 616 [M+H]. Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet



Ví dụ 24 - (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-flo-2-(hydroxymetyl)-2-metyltetrahydrofuran-3-ol.

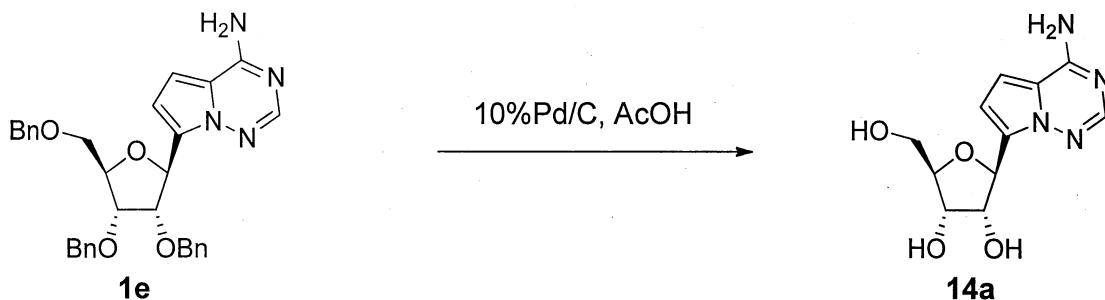
Chất trung gian có công thức 13b (145mg, 75% độ tinh khiết, 0,177mmol) được hòa tan trong THF (10ml) và TBAF (1M trong THF, 0,53ml, 0,531mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ và sau đó metanolic amoniac (7N, 10ml) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy trong

thời gian 24 giờ và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế (0% đến 35% axetonitril trong nước trong thời gian 20 phút) để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 24 (30mg, 60%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 7,78 (s, 1H), 6,84 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,76 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,53 (dd, $J = 21,5, 4,0$ Hz, 1H), 5,25 (ddd, $J = 55,5, 5,3, 4,1$ Hz, 1H), 4,44 (dd, $J = 17,2, 5,2$ Hz, 1H), 3,65 – 3,43 (m, 2H), 1,27 (s, 3H)

^{19}F NMR (376 MHz, CD_3OD) δ -197,08 (ddd, $J = 55,4, 21,5, 17,1$ Hz)

MS $m/z = 282$ $[\text{M}+\text{H}]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet.



Chất trung gian 14a - (2S,3R,4S,5R)-2-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-di-ol.

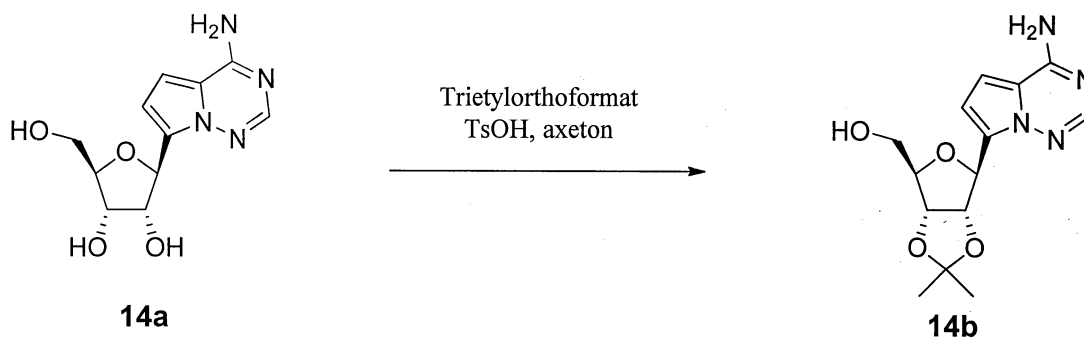
Chất trung gian có công thức 1e (2,64g, 4,91mmol) được hòa tan trong axit axetic (50ml). Bình này được sục argon và 10% Pd/C (1,05g, 0,982mmol) được bổ sung vào. Bình này được tháo rỗng và nạp đầy lại bằng $\text{H}_{2(\text{khí})}$ ba lần. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển $\text{H}_{2(\text{khí})}$. Sau thời gian 1 giờ, bình này được sục nitơ và hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit có rửa CH_3OH . Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm và sau đó đồng bay hơi với EtOAc, tiếp theo là các hexan. Cặn được đưa vào chân không cao để tạo ra chất trung gian có công thức 14a (1,31g, 99%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,80 (s, 1H), 7,66 (s, 2H), 6,82 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,66 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,09 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H), 5,06-4,56 (m, 3H), 4,21 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 3,93 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H), 3,77 (q, $J = 4,5$ Hz, 1H), 3,48 (ddd, $J = 38,9, 11,8, 4,4$ Hz, 2H).

LC/MS: $t_R = 0,47$ phút, MS $m/z = 267,13$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250

UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

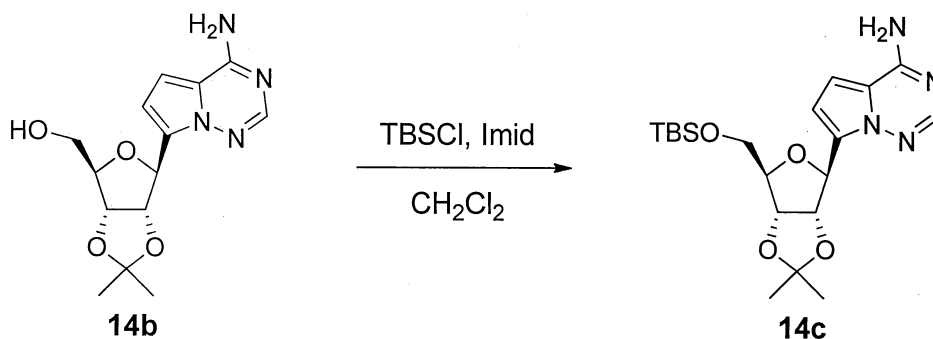


Chất trung gian 14b - ((3aR,4R,6S,6aS)-6-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)metanol.

Chất trung gian có công thức 14a (3,13g, 11,7mmol) được hòa tan trong axeton (80ml) và TsOH (6,00g, 31,5mmol) được bổ sung vào. Triethylorthoformat (6,0ml, 36,1mmol) được bổ sung từ từ vào trong thời gian 10 phút. Hỗn hợp thu được được để khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Dung dịch nước natri cacbonat bão hòa được bổ sung vào cho đến khi hỗn hợp phản ứng có độ pH=8. Các chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được phân bố giữa EtOAc và nước muối. Các pha được tách và các chất hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (60% đến 100% EtOAc/Hex - 20% MeOH/EtOAc) để tạo ra chất trung gian có công thức 14b (2,55g, 71%) ở dạng rắn màu trắng.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7,83 (s, 1H), 7,71 (s, 2H), 6,83 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,21 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 5,01 (dd, J = 6,6, 4,9 Hz, 1H), 4,84 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,71 (dd, J = 6,7, 3,7 Hz, 1H), 3,99 – 3,85 (m, 1H), 3,46 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 1,48 (s, 3H), 1,29 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 0,87$ phút, MS $m/z = 307,21$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



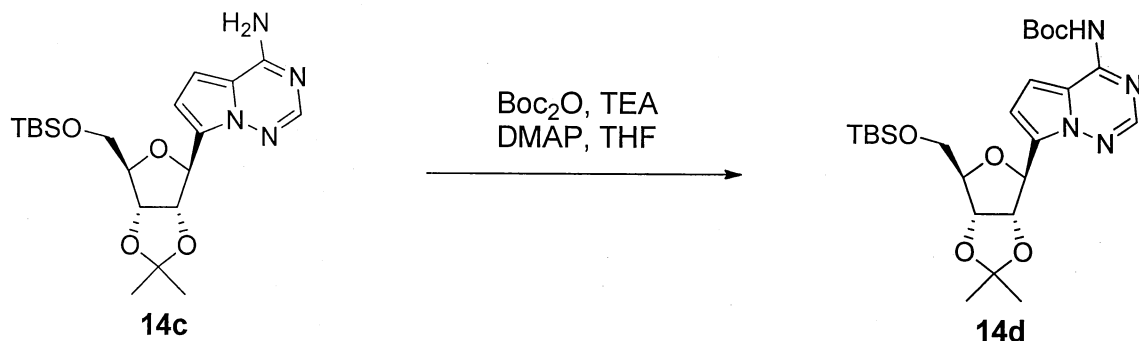
Chất trung gian 14c - 7-((3aS,4S,6R,6aR)-6-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-amin.

Chất trung gian có công thức 14b (2,55g, 8,32mmol) được hòa tan trong DCM (50ml) và hỗn hợp này được làm lạnh đến 0°C. Imidazol (1,70g, 24,9mmol) được bổ sung, tiếp theo là TBSCl (1,88g, 12,5mmol). Sau 16 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng metanol. Hỗn hợp thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn thô được phân bố giữa nước và EtOAc. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (50% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14c (2,60g, 74%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,83 (s, 1H), 7,74 (s, 2H), 6,82 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,68 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,26 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,00 (dd, $J = 6,5, 4,5$ Hz, 1H), 4,71 (dd, $J = 6,5, 3,7$ Hz, 1H), 3,97 (td, $J = 5,1, 3,6$ Hz, 1H), 3,64 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 1,48 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 0,83 (s, 9H), -0,02 (s, 6H).

LC/MS: $t_R = 1,91$ phút, MS $m/z = 421,60$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

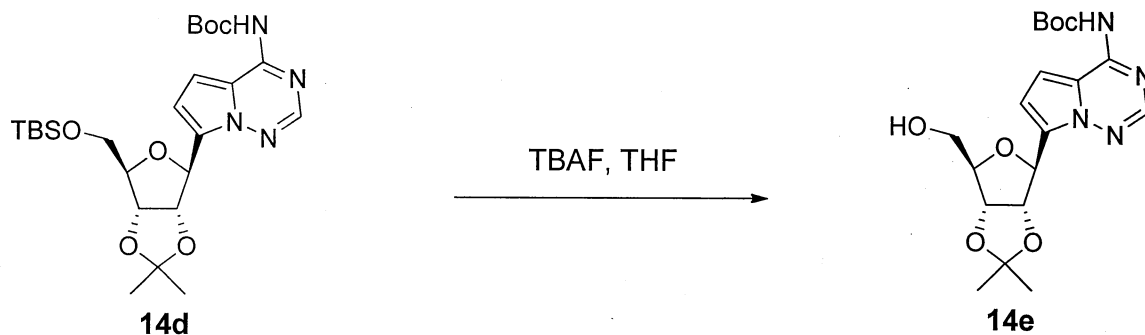


Chất trung gian 14d - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6R,6aR)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)methyl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)carbamate.

Chất trung gian có công thức 14c (2,59g, 6,16mmol) được hòa tan trong THF (60ml) và dung dịch thu được làm lạnh đến 0°C. Sau đó, Boc₂O (2,69g, 12,3mmol) và DMAP (0,3g, 2,46mmol) được bổ sung vào. TEA (2,56ml, 18,3mmol) được bổ sung từ từ vào và hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng. Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến 0°C và MeOH (10ml) được bổ sung vào, tiếp theo là dung dịch NH₄OH_(nước) (50ml) đậm đặc. Hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn thô được phân bố giữa EtOAc và nước. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14d (2,82g, 88%) ở dạng rắn màu trắng.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10,46 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,19 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,33 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 5,02 (dd, J = 6,5, 4,3 Hz, 1H), 4,72 (dd, J = 6,5, 3,6 Hz, 1H), 4,01 (q, J = 5,0 Hz, 1H), 3,64 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,32 (d, J = 22,7 Hz, 6H), 0,82 (s, 9H), -0,03 (s, 6H).

LC/MS: $t_R = 1,89$ phút, MS $m/z = 521,27$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



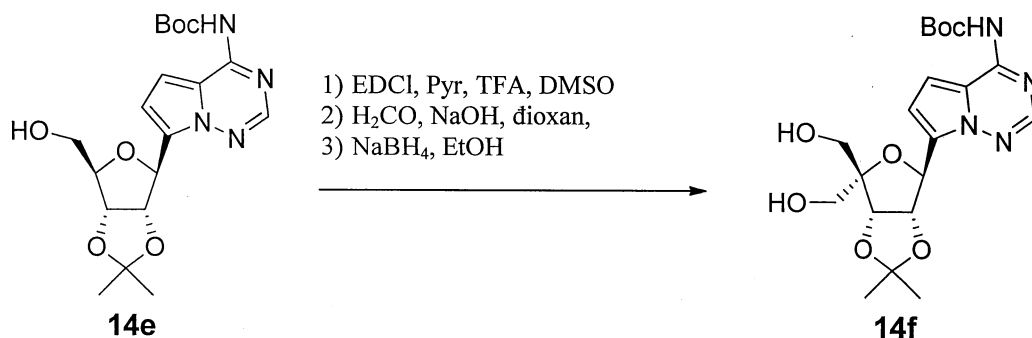
Chất trung gian 14e - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6R,6aR)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)carbamate.

Chất trung gian có công thức 14d (2,8g, 5,4mmol) được hòa tan trong THF (50ml), và TBAF (1,0M trong THF, 5,92ml, 5,92mmol) được bổ sung vào. Sau 30 phút, TBAF (1,0M trong THF, 5,92ml, 5,92mmol) được bổ sung thêm vào. Sau 30 phút nữa, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng nước và hỗn hợp thu được được chiết bằng EtOAc (2 x). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (10% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14e (2,19g, 86%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,46 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 5,29 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,03 (dd, $J = 6,6, 4,7$ Hz, 1H), 4,85 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,72 (dd, $J = 6,6, 3,6$ Hz, 1H), 4,05 – 3,90 (m, 1H), 3,46 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 1,50 (s, 12H), 1,29 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 1,52$ phút, MS $m/z = 407,05$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic;

Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 14f - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6aS)-6,6-bis(hydroxymetyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)carbamate.

Chất trung gian có công thức 14e (1,78g, 4,38mmol) được hòa tan trong DMSO (20ml) và toluen (15ml). Pyridin (0,35ml, 4,38mmol) và EDCI (1,26g, 6,56mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là TFA (0,178ml, 2,39mmol). Sau 90 phút, pyridin (0,35ml, 4,38mmol) và EDCI (1,26g, 6,56mmol) được bổ sung thêm vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian thêm 30 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng nước và hỗn hợp thu được được chiết bằng CH₂Cl₂. Phần nước được chiết ngược bằng CH₂Cl₂. Các lớp hữu cơ được kết hợp và rửa bằng nước muối, làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được đưa vào trong chân không cao trong thời gian 15 phút, sau đó được dùng cho bước tiếp theo.

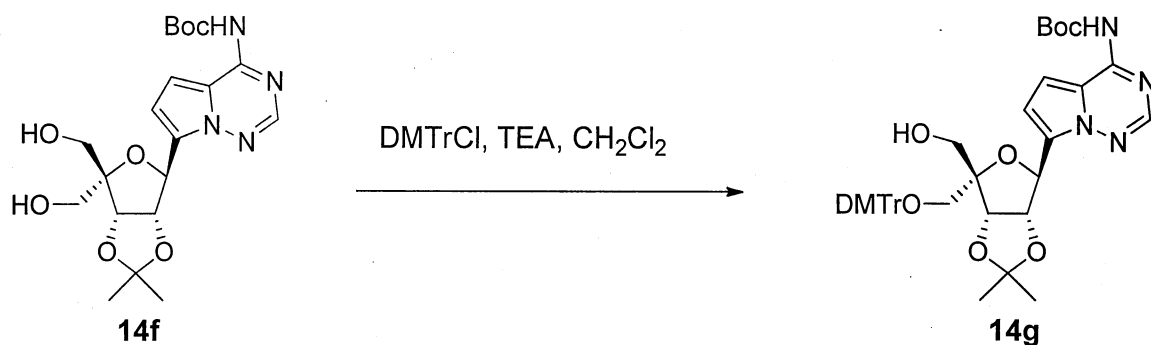
Cặn thô được hòa tan trong đioxan (15ml) và formaldehyt (37% trong nước, 5,0ml, 37,2mmol) và NaOH 2N (5,34ml, 10,7mmol) được bổ sung liên tục. Sau thời gian 10 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng AcOH và hỗn hợp thu được phân bố giữa dung dịch NaHCO₃(nước) bão hòa và CH₂Cl₂. Lớp nước được chiết ngược bằng CH₂Cl₂. Các lớp hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần thô được đưa vào chân không cao trong thời gian 15 phút, sau đó được lấy trực tiếp vào phản ứng tiếp theo.

Cặn thô được hòa tan trong EtOH (50ml), và NaBH₄ (0,324g, 8,76mmol) được bổ sung thành các phần nhỏ. Sau 20 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng AcOH và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được phân bố giữa EtOAc và dung dịch NaHCO₃(nước) bão hòa. Lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô trong điều

kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (50% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14f (1,91g, 68%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10,45 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,19 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 5,35 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 5,06 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,79-4,74 (m, 2H), 4,45 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 3,73 – 3,46 (m, 3H), 3,40 – 3,30 (m, 1H), 1,50 (s, 12H), 1,27 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 1,45$ phút, MS $m/z = 437,09$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 14g - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6S,6aS)-6-((bis(4-metoxypheyl)(phenyl)-metoxy)metyl)-6-(hydroxymetyl)-2,2-dimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)carbamate.

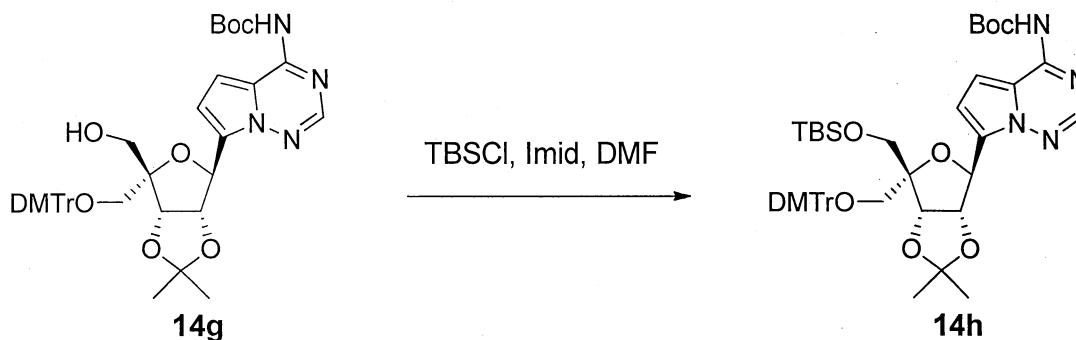
Chất trung gian có công thức 14f (1,15g, 2,63mmol) được hòa tan trong CH_2Cl_2 (50ml) và TEA (0,73ml, 5,27mmol) được bổ sung vào. Dung dịch thu được làm lạnh đến 0°C và DMTrCl (1,35g, 3,95mmol) được bổ sung vào. Sau thời gian 10 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng CH_3OH , sau đó được pha loãng bằng CH_2Cl_2 . Hỗn hợp thu được được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa và nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương

pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14g (1,95g, 79%) ở dạng rắn màu trắng đục.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10,46 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,56 – 7,07 (m, 10H), 7,07 – 6,70 (m, 5H), 5,24 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 5,04 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,93 – 4,71 (m, 2H), 3,80 – 3,59 (m, 7H), 3,52 (dd, J = 10,9, 4,8 Hz, 1H), 3,25 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 3,09 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 1,50 (s, 9H), 1,25 (s, 3H), 1,21 (s, 3H).

LC/MS: t_R = 2,54 phút, MS m/z = 739,28 $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

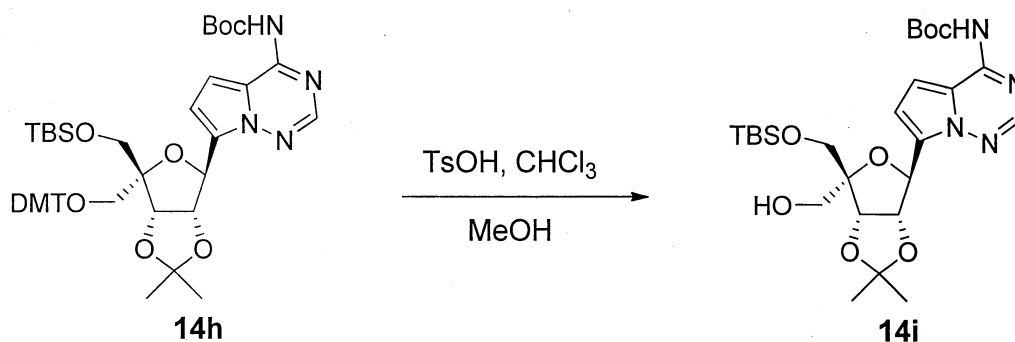


Chất trung gian 14h - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-((bis(4-metoxypheyl)(phenyl)-metoxy)metyl)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d]-[1,3]đioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)carbamát.

Chất trung gian có công thức 14g (1,53g, 2,08mmol) được hòa tan trong DMF (10ml) và imidazol (0,42g, 6,23mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là TBSCl (0,47g, 3,11mmol). Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng metanol và phân bố giữa EtOAc và 5% $\text{LiCl}_{(\text{nước})}$. Các pha được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 50% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14h (1,77g, 78%) ở dạng rắn màu trắng đục.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10,47 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,56 – 6,66 (m, 15H), 5,31 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 5,14 (dd, J = 6,5, 4,9 Hz, 1H), 4,73 (d, J = 6,5 Hz, 1H), 3,87 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 3,72 (s, 6H), 3,53 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 3,31 (m, 1H), 3,08 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 1,50 (s, 9H), 1,25 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 0,75 (s, 9H), -0,04 (s, 3H), -0,08 (s, 3H).

LC/MS: t_R = 2,34 phút, MS m/z = 853,50 $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,0 phút 2% đến 100% ACN, 1,0 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 14i - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)methyl)-6-(hydroxymethyl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f]-[1,2,4]triazin-4-yl)carbammat.

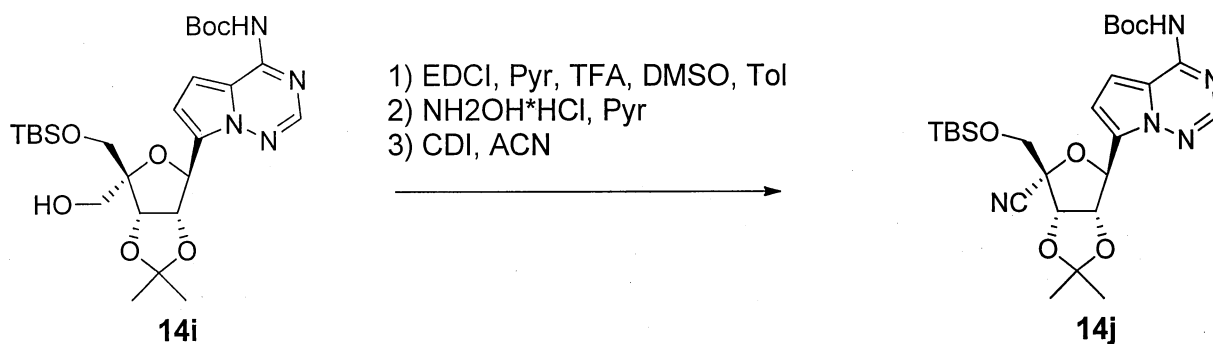
Chất trung gian có công thức 14h (1,38g, 1,62mmol) được hòa tan trong clorofom (20ml) và dung dịch thu được làm lạnh đến 0°C. Sau đó, dung dịch chứa TsOH (0,34g, 1,78mmol) trong CH₃OH (16ml) được bổ sung vào từ từ. Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng dung dịch NaHCO₃(nước) bão hòa, và hỗn hợp thu được phân bố giữa EtOAc và nước muối. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14i (0,84g, 94%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10,42 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 6,89 (s, 1H),

5,37 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 5,05 (dd, $J = 6,2, 4,8$ Hz, 1H), 4,71 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H), 4,51 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,70 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 3,59 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H), 3,49 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 1,49 (s, 12H), 1,28 (s, 3H), 0,82 (s, 9H), -0,01 (s, 3H), -0,02 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 1,88$ phút, MS $m/z = 551,25$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC

Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,0 phút 2% đến 100% ACN, 1,0 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 14j - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)methyl)-6-xyano-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)carbamate.

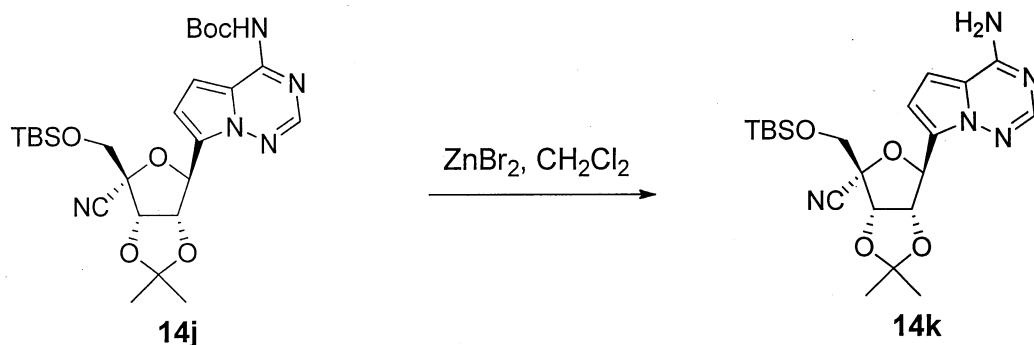
Chất trung gian có công thức 14i (0,838g, 1,52mmol) được hòa tan trong DMSO (5ml) và toluen (3ml). Pyridin (0,14ml, 1,67mmol) và EDCI (0,438g, 2,28mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là TFA (0,057ml, 0,761mmol). Sau 30 phút, thêm pyridin (0,14ml, 1,67mmol) và EDCI (0,438g, 2,28mmol) được bổ sung vào. Sau thời gian 1 giờ, thêm pyridin (0,14ml, 1,67mmol) và EDCI (0,438g, 2,28mmol) được bổ sung vào. Sau 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng $\frac{1}{2}$ dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa và phân bố giữa EtOAc và $\frac{1}{2}$ dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được hòa tan trong CH_2Cl_2 được cô trong chân không cao trong thời gian 1 giờ để tạo ra cặn mà được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo.

Cặn được hòa tan trong pyridin (8ml) và hydroxylamin hydroclorua (0,159g, 2,28mmol) được bổ sung vào một lần. Sau 15 phút, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm và phân bố giữa EtOAc và nước. Lốp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được đặt trong chân không cao trong thời gian 30 phút và sử dụng như vậy cho bước thứ ba.

Cặn thô được hòa tan trong ACN (8ml). CDI (0,37g, 2,28mmol) được bổ sung vào một lần. Sau 45 phút, thêm CDI (0,37g, 2,28mmol) được bổ sung vào. Sau thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng $\frac{1}{2}$ dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Chất thô được phân bố giữa EtOAc và $\frac{1}{2}$ dung dịch NaHCO_3 (nước) bão hòa. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 50% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14j (0,72g, 87%) ở dạng rắn màu trắng.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10,53 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,00 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,62 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 5,28 (dd, J = 6,6, 3,7 Hz, 1H), 4,93 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 3,83 (s, 2H), 1,62 (s, 3H), 1,50 (s, 9H), 1,33 (s, 3H), 0,83 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

LC/MS: $t_R = 2,50$ phút, MS $m/z = 546,15$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex $2,6\mu$ XB-C18 100A, $50 \times 3,00$ mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

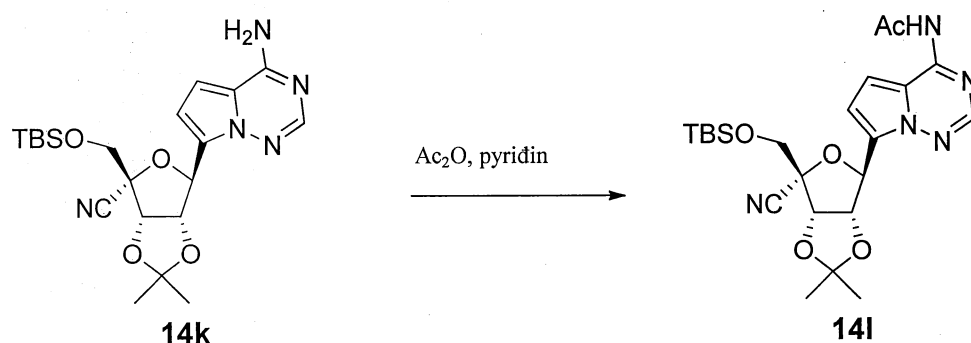


Chất trung gian 14k - (3aS,4R,6S,6aS)-6-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-cacbonitril.

Chất trung gian có công thức 14j (0,688g, 1,26mmol) được hòa tan trong CH_2Cl_2 (15ml). Kẽm bromua (0,567g, 2,52mmol) được bổ sung vào một lần và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường. Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng này được bổ sung vào khay chứa silic đioxit và tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (40% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14k (0,56g, 99%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,86 (s, 1H), 7,80 (s, 2H), 6,85 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 6,79 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,55 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 5,25 (dd, $J = 6,6, 3,8$ Hz, 1H), 4,92 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,82 (s, 2H), 1,61 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 0,83 (s, 9H), -0,13 (s, 6H).

LC/MS: $t_R = 2,27$ phút, MS $m/z = 446,68$ $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



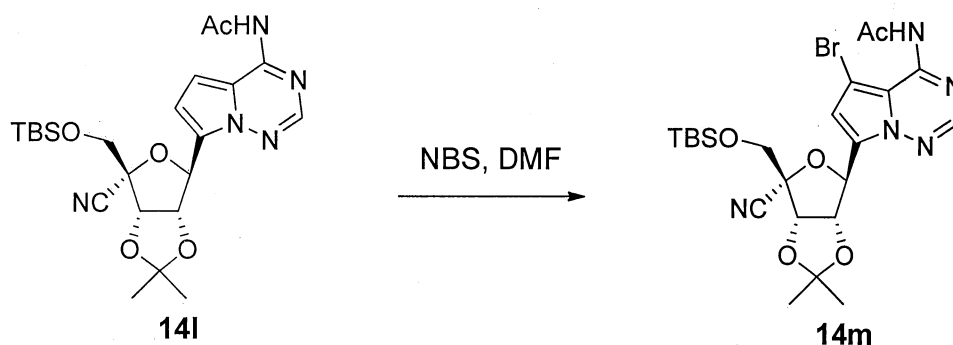
Chất trung gian 14l - N-(7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-6-xyano-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)axetamit.

Chất trung gian có công thức 14k (0,20g, 0,449mmol) được hòa tan trong pyridin (2ml), sau đó axetic anhydrit (0,21ml, 2,24mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng

này được khuấy ở nhiệt độ môi trường. Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng metanol và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế một cách trực tiếp theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 100% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14l (0,185g, 85%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10,87 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,24 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 7,05 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 5,65 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 5,29 (dd, $J = 6,6, 3,6$ Hz, 1H), 4,93 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), 2,36 (s, 3H), 1,62 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 0,83 (s, 9H), 0,00 (s, 3H), -0,01 (s, 3H).

LC/MS: $t_R = 1,14$ phút, MS $m/z = 488,38$ [M+1]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.

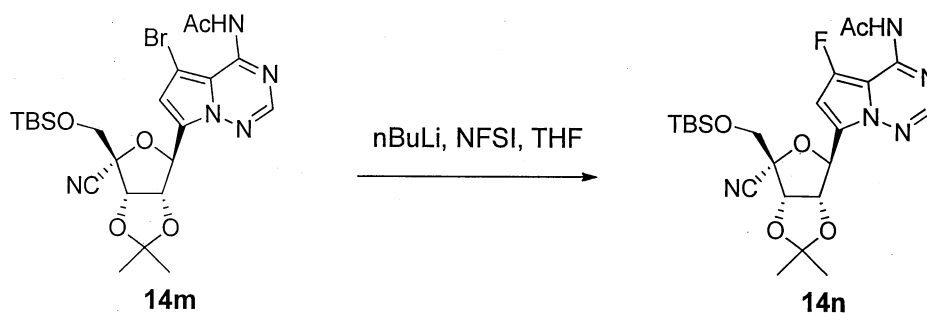


Chất trung gian 14m - N-(5-bromo-7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)-6-xyano-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrrolo[2,1-f][1,2,4]-triazin-4-yl)axetamit.

Chất trung gian có công thức 14l (80mg, 0,164mmol) được hòa tan trong DMF (2ml) và NBS (29mg, 0,164mmol) được bổ sung vào một lần. Sau 45 phút, hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng metanol. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 50% EtOAc/Hex) để tạo ra chất trung gian có công thức 14m (50mg, 54%) ở dạng rắn màu trắng đục.

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10,13 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 5,65 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 5,29 (dd, J = 6,6, 3,2 Hz, 1H), 4,91 (d, J = 6,5 Hz, 1H), 3,84 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 2,27 (s, 3H), 1,62 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 0,83 (s, 9H), 0,02 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

LC/MS: t_R = 1,79 phút, MS m/z = 566,40 $[M+1]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



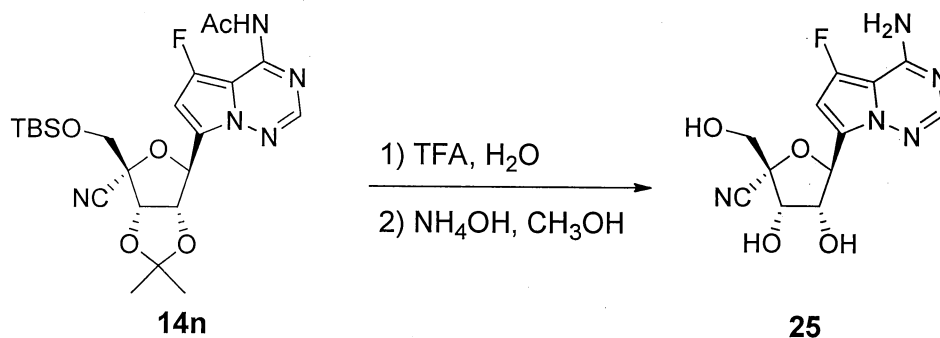
Chất trung gian 14n - N-(7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)metyl)-6-xyano-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)-5-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-4-yl)axetamit.

Chất trung gian có công thức 14m (50mg, 0,088mmol) được hòa tan trong THF (2ml) và dung dịch được làm lạnh đến -78°C . nBuLi (2,5M trong hexan, 0,071ml, 0,18mmol) được bổ sung vào. Sau 5 phút, N-flobenzensulfonimit (NSFI, 33,4mg, 0,106mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 5 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng AcOH. Các dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp pha đảo để tạo ra chất trung gian có công thức 14n (10mg, 22%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, Metanol- d_4) δ 8,13 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 5,65 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 5,23 (dd, J = 6,7, 3,6 Hz, 1H), 4,97 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 3,92 (d, J = 1,7 Hz, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,70 (s, 3H), 1,38 (s, 3H), 0,90 (s, 9H), 0,08 (s, 6H).

^{19}F NMR (376 MHz, Metanol- d_4) δ -156,43 (s).

LC/MS: $t_R = 1,65$ phút, MS $m/z = 506,18$ $[M+H]^+$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 2,4 phút 2% đến 100% ACN, 2,4 phút đến 2,80 phút 100% ACN, 2,8 phút đến 2,85 phút 100% đến 2% ACN, 2,85 phút đến 3,0 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



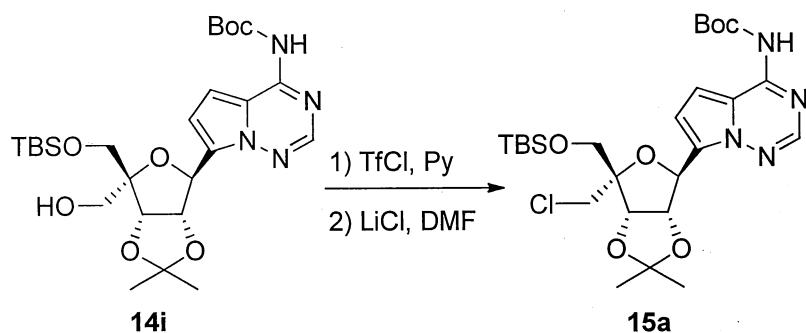
Ví dụ 25 - (2R,3S,4R,5S)-5-(4-amino-5-flopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-di-hydroxy-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-2-cacbonitril.

Chất trung gian có công thức 14n (11mg, 0,022mmol) được đưa vào dung dịch chứa 50% dung dịch TFA trong nước ở nhiệt độ môi trường. Sau 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng Na_2CO_3 rắn để đạt được độ pH = 8. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp pha đảo. Các phân đoạn chứa hợp chất theo Ví dụ 25 được kết hợp và để riêng và các phân đoạn chứa N6-axyl được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn chất trung gian N6-axyl được đưa vào $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{nước})}$ đậm đặc (1ml) và hỗn hợp này được để khuấy ở nhiệt độ môi trường. Sau 30 phút, hỗn hợp thu được được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Các phân đoạn chứa Ví dụ 25 được kết hợp với các phân đoạn chứa hợp chất theo Ví dụ 25 để riêng trước đó để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 25 (4mg, 58%) ở dạng rắn màu trắng.

^1H NMR (400MHz, Metanol- d_6) δ 7,71 (s, 1H), 6,56 (s, 1H), 5,44 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,36 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,83 ((ABq, $\Delta\delta = 0,05\text{ppm}$, $J = 12$ Hz, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, Metanol- d_4) δ -161,81 (s).

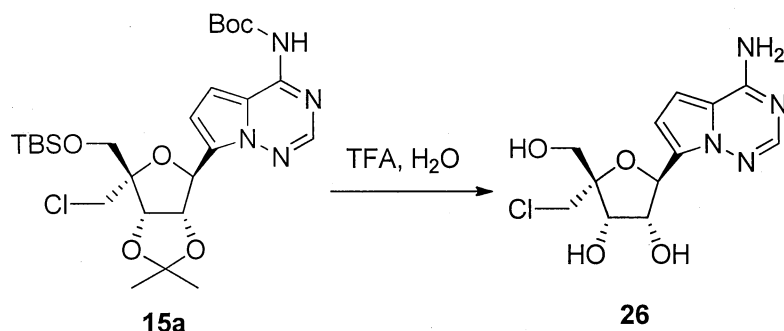
LC/MS: $t_R = 0,47$ phút, MS $m/z = 310,13$ [M+H]⁺; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 3,00mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit formic, nước với 0,1% axit formic; Gradient: 0 phút đến 1,4 phút 2% đến 100% ACN, 1,4 phút đến 1,80 phút 100% ACN, 1,8 phút đến 1,85 phút 100% đến 2% ACN, 1,85 phút đến 2 phút 2% ACN ở 1,8ml/phút.



Chất trung gian 15a - Tert-butyl (7-((3aS,4S,6R,6aS)-6-(((tert-butylđimetylsilyl)oxy)methyl)-6-(clometyl)-2,2-đimetyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]đioxol-4-yl)pyrolo[2,1-f]-[1,2,4]triazin-4-yl)carbammat.

Chất trung gian có công thức 14i (100mg, 0,18mmol) được hòa tan trong khan pyridin (5ml). Triflometansulfonyl clorua (23μl, 0,22mmol) được bổ sung một lần vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, triflometansulfonyl clorua (100μl) được bổ sung tiếp vào. Sau 30 phút, triflometansulfonyl clorua (100μl) được bổ sung thêm vào. Sau 30 phút nữa, triflometansulfonyl clorua (100μl) được bổ sung thêm nữa vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 30 phút, tại thời điểm đó hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được hòa tan trong DMF khan (5ml) và lithi clorua (153mg, 3,6mmol) sau đó được bổ sung vào thành một lần. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng etyl axetat (50ml) và rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa dung dịch (3 x 20ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan và cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (0% đến 20% etyl axetat trong hexan) để tạo ra chất trung gian có công thức 15a.

MS m/z = 569,0 $[M+H]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage

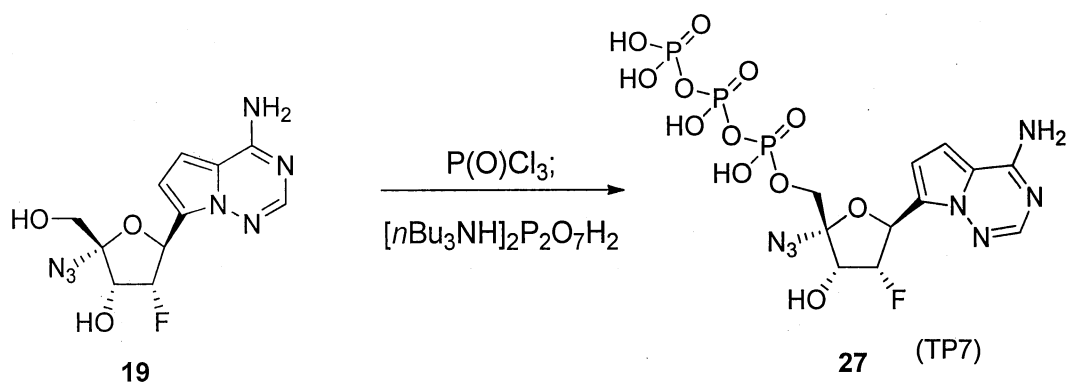


Ví dụ 26 - (2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-(clometyl)-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3,4-di-ol.

Chất trung gian có công thức 15a được hòa tan trong dung dịch chứa TFA và nước (theo tỷ lệ 1:1, 5ml) và hỗn hợp thu được được khuấy trong thời gian 16 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn thô được hòa tan trong dung dịch nước natri bicacbonat và axetonitril và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 26 (19mg, 34%) ở dạng bột màu trắng.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,61 (s, 1H), 6,72 – 6,64 (m, 2H), 5,19 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 4,73 – 4,66 (m, 1H), 4,28 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,78 (s, 2H), 3,72 – 3,57 (m, 2H).

MS m/z = 315,3 $[M+H]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage



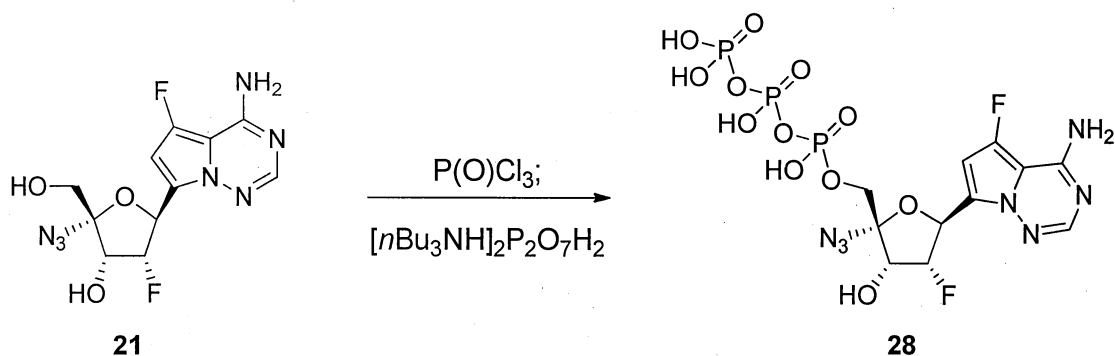
Ví dụ 27 (còn được gọi là TP7) - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-fluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

Hợp chất theo Ví dụ 27 được điều chế ở dạng muối tetra-natri theo cách tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ TP4 bắt đầu với hợp chất theo Ví dụ 19.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,76 (s, 1H), 6,83 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 5,94 (d, $J = 25,2$ Hz, 1H), 5,24 (dd, $J = 55,2, 5,2$ Hz, 1H), 4,78 (dd, $J = 26,8, 5,2$ Hz, 1H), 4,08 – 4,18 (m, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -193,74 – -194,02 (m).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -4,60 (d, $J = 53,2$ Hz, 1P), -10,25 (d, $J = 48,4$ Hz, 1P), -20,28 (t, $J = 48,4$ Hz, 1P).



Ví dụ 28 - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-5-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

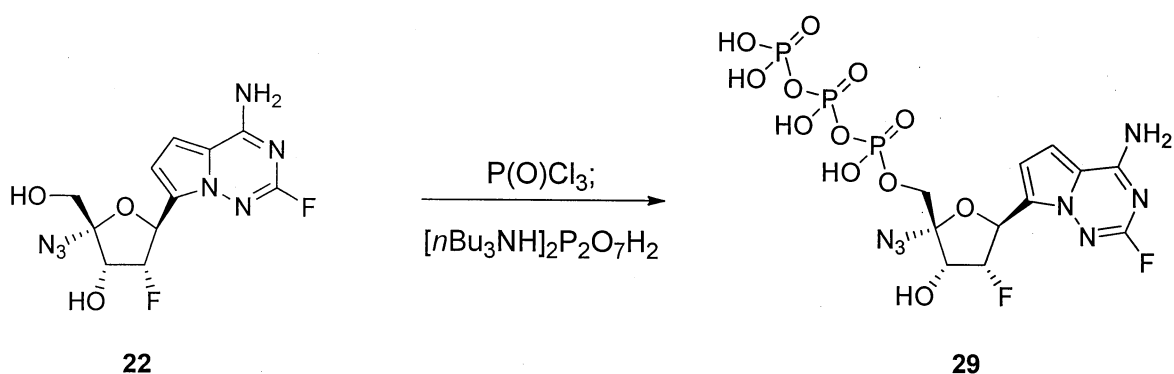
Hợp chất theo Ví dụ 28 được điều chế ở dạng muối tetra-natri theo cách tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ TP4 bắt đầu với hợp chất theo Ví dụ 21.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,64 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 5,90 (d, $J = 24,4$ Hz, 1H), 5,20 (dd, $J = 54,8, 4,8$ Hz, 1H), 4,72 (dd, $J = 27,2, 4,8$ Hz, 1H), 4,05 – 4,18 (m, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -161,00 (s), -196,39 – -196,69 (m).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -8,24 (d, $J = 50,4$ Hz), -14,20 (d, $J = 46,0$ Hz), -24,08 (t, $J = 48,4$ Hz).

MS $m/z = 567,87$ [$\text{M}+1$]. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage



Ví dụ 29 - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-2-flopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-azido-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

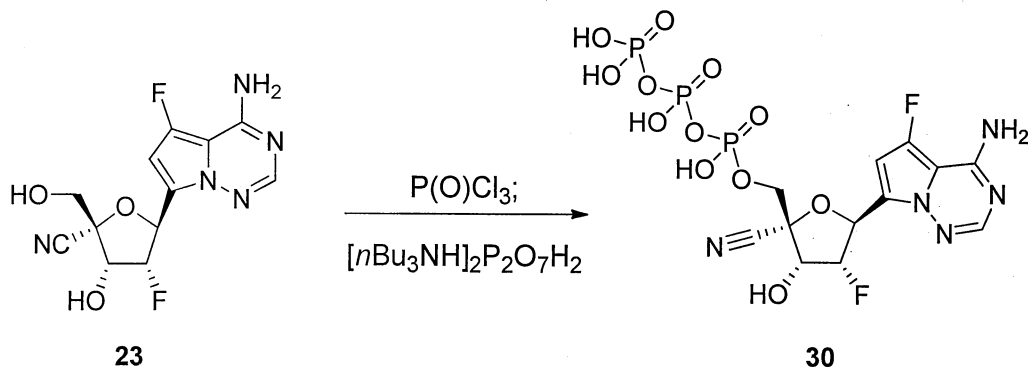
Hợp chất theo Ví dụ 29 được điều chế như muối tetra-natri theo cách tương tự mà đã được mô tả trong Ví dụ TP4 bắt đầu với Ví dụ 22.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 6,81 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 5,81 (d, $J = 24,4$ Hz, 1H), 5,16 (dd, $J = 54,4, 4,8$ Hz, 1H), 4,70 (dd, $J = 26,8, 4,4$ Hz, 1H), 4,02-4,12 (m, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -75,95 (s), -196,51 – -196,80 (m).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -8,29 (d, $J = 53,2$ Hz), -14,22 (d, $J = 48,4$ Hz), -24,09 (t, $J = 48,4$ Hz).

MS $m/z = 567,59$ $[\text{M}+1]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage



Ví dụ 30 - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-5-flopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-xyano-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

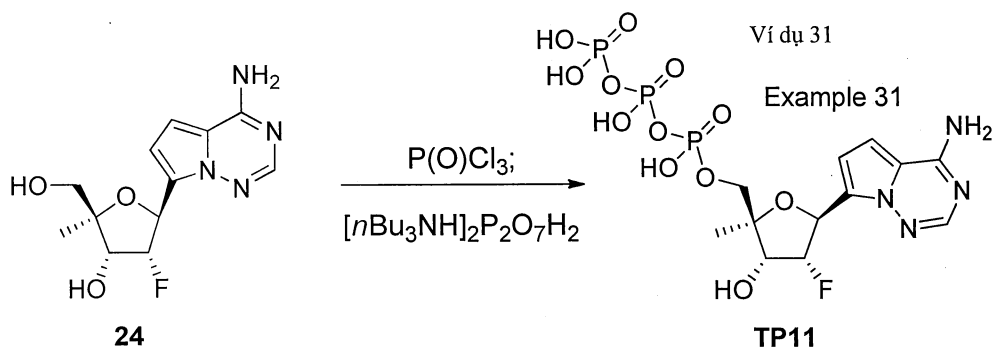
Hợp chất theo Ví dụ 30 được điều chế ở dạng muối tetra-natri theo cách tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ TP4 bắt đầu với hợp chất theo Ví dụ 23.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,64 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 5,87 (d, $J = 24,8$ Hz, 1H), 5,26 (dd, $J = 53,6, 4,0$ Hz, 1H), 4,82 (dd, $J = 25,2, 4,4$ Hz, 1H), 4,26-4,35 (m, 2H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -161,05 (s), -194,92 – -195,19 (m).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -8,22 (d, $J = 50,8$ Hz), -14,48 (d, $J = 48,4$ Hz), -24,01 (t, $J = 48,4$ Hz).

MS $m/z = 551,91$ $[\text{M}+1]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage



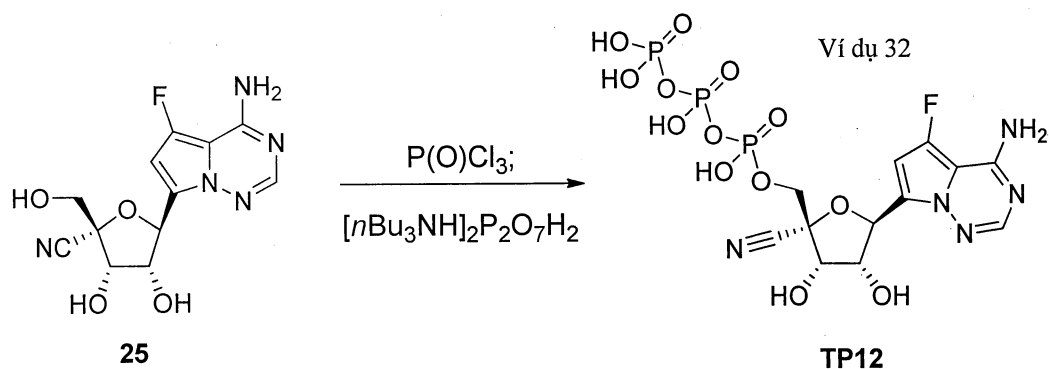
Ví dụ 31 (còn được gọi là TP11) - ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-2-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl tetrahydrogen triphosphat.

Hợp chất theo Ví dụ 31 được điều chế ở dạng muối tetra-natri theo cách tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ TP4 bắt đầu với hợp chất theo Ví dụ 24

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,66 (s, 1H), 6,78 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 6,72 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,58 (dd, $J = 23,6, 2,4$ Hz, 1H), 5,16 (ddd, $J = 55,2, 5,2, 2,8$ Hz, 1H), 4,51 (dd, $J = 23,2, 5,2$ Hz, 1H), 3,88 (dd, $J = 11,6, 6,0$ Hz, 1H), 3,78 (dd, $J = 10,8, 4,0$ Hz, 1H), 1,2 (s, 3H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -195,74 – -196,01 (m).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -8,24 (d, $J = 50,4$ Hz), -13,54 (d, $J = 45,6$ Hz), -24,11 (t, $J = 48,0$ Hz).



Ví dụ 32 (còn được gọi là TP12) - ((2R,3S,4R,5S)-5-(4-amino-5-flopyrolo[2,1-f][1,2,4]-triazin-7-yl)-2-xyano-3,4-đihydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

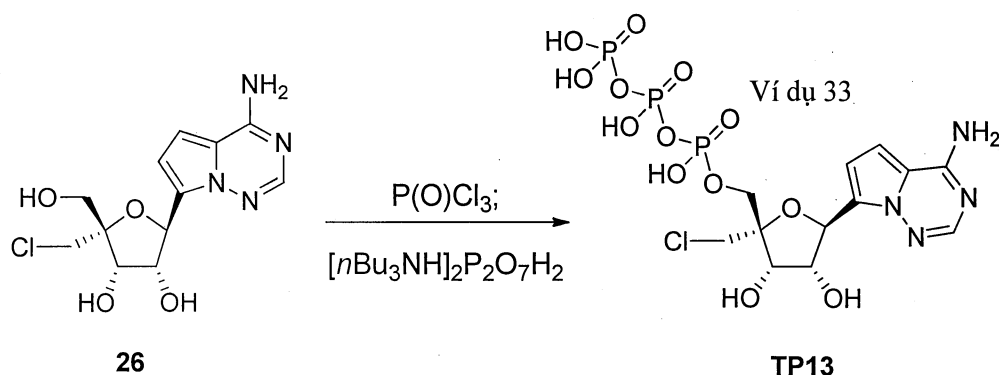
Hợp chất theo Ví dụ 32 được điều chế ở dạng muối tetra-natri theo cách tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ TP4 bắt đầu với hợp chất theo Ví dụ 25.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,59 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 5,44 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,56 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,48 (dd, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,16 (dd, $J = 11,6, 6,0$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 11,2, 5,2$ Hz, 1H).

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -161,25 (s).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -8,29 (d, $J = 48,4$ Hz), -14,49 (d, $J = 53,2$ Hz), -24,15 (t, $J = 48,4$ Hz).

MS $m/z = 549,90$ $[\text{M}+1]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage



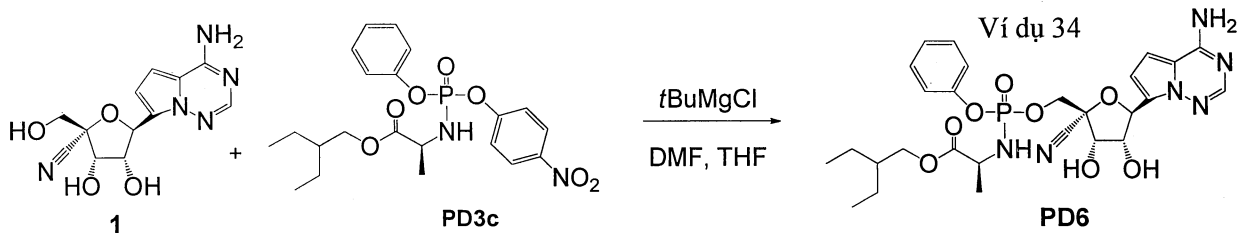
Ví dụ 33 (còn được gọi là TP13) - ((2R,3S,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-(clometyl)-3,4-đihydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat.

Hợp chất theo Ví dụ 33 được điều chế ở dạng muối tetra-trietylamin theo cách tương tự như đã được mô tả trong Ví dụ TP3 bắt đầu với hợp chất theo Ví dụ 26.

^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 7,76 (s, 1H), 6,92 (br s, 1H), 6,85 (br s, 1H), 5,32 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 4,78 (dd, $J = 8, 6,4$ Hz, 1H), 4,53 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 10,0, 4,0$ Hz, 1H), 3,83 – 3,95 (m, 3H), 3,07 (q, $J = 7,6$ Hz, 24 H), 1,16 (t, $J = 7,6$ Hz, 36 H).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ -9,44 (d, $J = 45,6$ Hz), -11,51 (d, $J = 48,8$ Hz), -22,95 (t, $J = 48,4$ Hz).

MS $m/z = 555,06$ $[\text{M}+1]$. Hệ thống MS: Thermo LCQ Advantage



Ví dụ 34 (còn được gọi là PD6) - (2S)-2-etylbutyl 2-((((((2R,3R,4R,5S)-5-(4-amino-pyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-2-xyano-4-flo-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

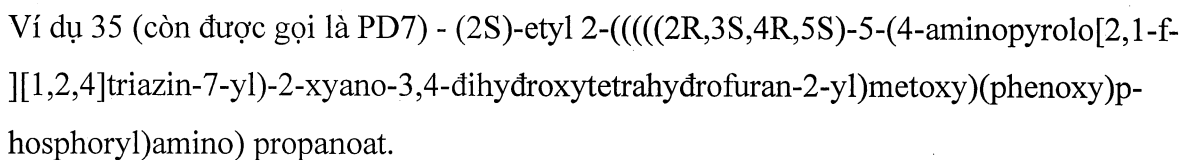
Hợp chất theo Ví dụ 1 (3,8mg, 0,013mmol) được hòa tan trong N-metyl-2-pyrrolidon (0,2ml) khan và THF (0,1ml) được bổ sung vào trong khí quyển argon. Sau đó, tert-butyl magie clorua (1M trong THF, 20μl, 0,024mmol) được bổ sung vào ở nhiệt độ trong phòng, và chất rắn màu trắng kết tủa. Sau 5 phút, dung dịch chứa p-nitrophenyl-phosphoramidat PD3c (12mg, 0,026mmol) trong THF (0,1ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng thành một lần, và hỗn hợp thu được được nâng nhiệt độ lên đến 50°C. Sau 20 giờ, hỗn hợp phản ứng được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và sau đó được tinh chế một cách trực tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp điều chế (cột Phenominex Synergi 4u Hydro-RR 80Å 150 x 30mm, 40% đến 100% axetonitril/nước gradien). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất theo Ví dụ 34 (2,9mg, 37%, hỗn hợp chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ 3:2) ở dạng rắn màu trắng.

¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,80 (s, 0,3H), 7,78 (s, 0,6H), 7,38 – 7,10 (m, 5H), 6,85 (br dd, J = 4,7, 2,2 Hz, 1H), 6,75 – 6,71 (m, 1H), 5,54 – 5,46 (m, 1H), 4,65 – 4,58 (m, 1H), 4,53 – 4,31 (m, 3H), 4,07 – 3,84 (m, 3H), 1,54 – 1,39 (m, 1H), 1,38 – 1,19 (m, 7H), 0,92 – 0,81 (m, 6H) 29H

 ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ 3,25 (br s).

LC/MS: $t_R = 1,55$ phút, MS $m/z = 603,19$ [M+H]; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic;

HPLC: t_R = 2,98 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.



¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7,80 (d, J = 2,3 Hz, 0,4H), 7,78 (d, J = 2,3 Hz, 0,6H), 7,36 – 7,12 (m, 5H), 6,88 – 6,81 (m, 1H), 6,76 – 6,70 (m, 1H), 5,53 – 5,46 (m, 1H), 4,66 –

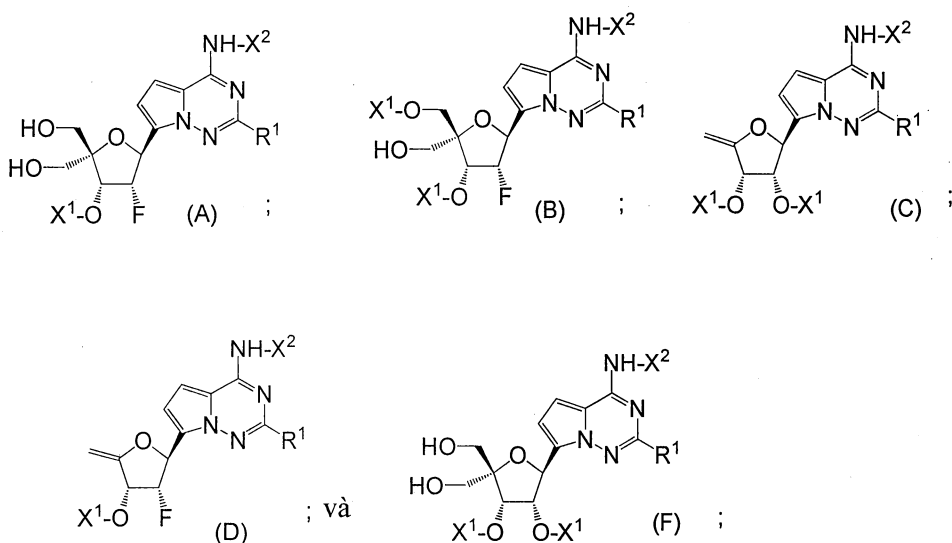
4,60 (m, 1H), 4,55 – 4,30 (m, 3H), 4,15 – 3,98 (m, 2H), 3,93 – 3,79 (m, 1H), 1,30 – 1,12 (m, 6H).

^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ 3,27 (br s).

LC/MS: t_R của chất đồng phân không đối quang chính = 1,28 phút, MS m/z = 547,14 $[\text{M}+\text{H}]$, t_R của chất đồng phân không đối quang phụ = 1,30 phút, MS m/z = 547,04 $[\text{M}+\text{H}]$; hệ thống LC: Thermo Accela 1250 UHPLC; Hệ thống MS: Thermo LCQ Fleet; Cột: Kinetex 2,6 μ XB-C18 100A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% axit axetic, nước với 0,1% axit axetic; Gradient: 0 phút đến 2,0 phút 2% đến 100% ACN, 2,0 phút đến 3,05 phút 100% ACN, 3,05 phút đến 3,2 phút 100% đến 2% ACN, 3,2 phút đến 3,5 phút 2% ACN ở 2 μ l/phút.

HPLC: t_R của chất đồng phân không đối quang chính = 2,44 phút, t_R của chất đồng phân không đối quang phụ = 2,46 phút; hệ thống sắc ký lỏng cao áp: loại Agilent 1100; Cột: Gemini 5 μ C18 110A, 50 x 4,6mm; các dung môi: axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA; Gradient: 0 phút đến 5,0 phút 2% đến 98% ACN, 5,0 phút đến 6,0 phút 98% ACN ở 2ml/phút.

Sáng chế còn đề xuất các phương án riêng biệt lần lượt là các hợp chất có công thức (A), công thức (B), công thức (C), công thức (D), và công thức (E):



trong đó, trong mỗi trường hợp, X^1 thể hiện nhóm bảo vệ oxy và X^2 thể hiện nhóm bảo vệ amin.

Các nhóm bảo vệ oxy hữu ích bao gồm nhóm bảo vệ silyl ete hoặc nhóm bảo vệ loại benzyl, kể cả các nhóm metoxybenzyl.

Các nhóm bảo vệ ete silyl hữu ích bao gồm các nhóm bảo vệ trimetylsilyl (TMS), trietylsilyl (TES), đimetylisopropylsilyl (IPDMS), dietylisopropylsilyl (DEIPS), đimethylhexylsilyl (TDS), t-butylđimetylsilyl (TBS hoặc TBDMS), t-butylđiphenylsilyl (TBDPS), tribenzylsilyl, tri-p-xylylsilyl, triisopropylsilyl (TIPS), diphenylmetylsilyl (DPMS), di-t-butylmetylsilyl (DTBMS), triphenylsilyl (TPS), metylđiphenylsilyl (MDPS), t-butylmetoxyphenylsilyl, tris(trimetylsilyl)silyl (sisyl), (2-hydroxystyryl)đimetylsilyl (HSDMS), (2-hydroxystyryl)điisopropylsilyl (HSDIS), t-butylmetoxyphenylsilyl (TBMPS), và t-butoxyđiphenylsilyl (DPTBOS).

Các nhóm bảo vệ kiểu benzyl hữu ích bao gồm benzyl, benzyl đã halogen hóa, p-metoxybenzyl, benzyloxymetyl, 2,4-đimetoxybenzyl, 3,4-đimetoxybenzyl, 2,6-đimetoxybenzyl, p-CF₃-benzyl, p-metylbenzyl, p-metoxylbenzyl, 3,5-đimetylbenzyl, p-tert-butylbenzyl, o-nitrobenzyl, p-nitrobenzyl, p-halobenzy, kể cả p-Br-benzyl, 2,6-điclobenzyl, p-xyanobenzy, p-phenylbenzyl, 2,6-điflobenzyl, p-axylaminobenzy (PAB), p-azidobenzy (Azb), 4-azido-3-clobenzyl, 2-triflometylbenzyl, p-(metylsulfinyl)benzyl, 2-picolyl, 4-picolyl, 3-metyl-2-picolyl N-oxido, 2-quinolinylmetyl, diphenylmetyl (DPM), p,p'-đinitrobenzhyđryl, triphenylmetyl, alpha-naphtylđiphenylmetyl, p-metoxyphenylđiphenylmetyl, di(p-metoxyphenyl)phenylmetyl, tri(p-metoxyphenyl)metyl, 4,4',4''-tris(benzoyloxyphenyl)metyl, và các nhóm bảo vệ 2-naphtylmetyl.

Các nhóm bảo vệ amin hữu ích bao gồm các nhóm bảo vệ p-metoxybenzyl cacbonyl (Moz hoặc MeOZ), axetyl (Ac), benzoyl (Bz), p-metoxybenzyl (PMB), 3,4-đimetoxybenzyl (DMPM), p-metoxyphenyl (PMP), tosyl (Ts hoặc Tos), trifloaxetamit, và trityl. Các nhóm bảo vệ amin hữu ích còn bao gồm các nhóm bảo vệ carbamat và các nhóm bảo vệ amit. Các ví dụ về các nhóm bảo vệ carbamat bao gồm các metyl và etyl carbamat như 9-florenylmetyloxycacbonyl (FMOC), 9-(2-sulfo)florenylmetyl, 9-(2,7-đibromo)florenylmetyl, 17-tetrabenzo[a,c,g,i]florenylmetyl (Tbfmoc), 2-clo-3-inđenylmetyl (Climoc), benz[f]inden-3-ylmetyl (Bimoc), 2,7-đi-t-butyl[9-(10,10-đioxo-10,10,10,10-tetrahydrothioxanyl)]metyl (DBD-Tmoc), [2-(1,3-đithianyl)metyl (Dmoc), và 1,1-đioxo-benzo[b]thiophen-2-ylmetyl (Bsmoc) carbamat.

Các ví dụ về etyl carbamat được thể hữu ích bao gồm 1,1-đimetyl-2-xyanoetyl, 2-phosphonioetyl (Peoc), 2-metylthioetyl, 2-(p-toluensulfonyl)etyl, 2,2,2,-tricloetyl (Troc), 2-(trimetylsilyl)etyl (Teoc), 2-phenyletyl (hZ), 1-(1-đadamantyl)-1-metyletyl (Adpoc), 1,1-đimetyl-2-brometyl, 1,1-đimetyl-2-cloetyl, 1,1-đimetyl-2,2-đibromoetyl (DB-t-BOC), 1,1-đimetyl-2,2,2-tricloetyl (TCBOC), 1-metyl-1-(4-biphenyl)etyl (Bpoc), 1-(3,5-đi-t-butylphenyl)-1-metyletyl (t-Bumeoc), 2-(2'pyridyl)etyl, 2-(4'pyridyl)etyl, 2,2-bis(4'-nitrophenyl)etyl (Bnpeoc), N-(2-pivaloylamino)-1,1,đimetyletyl, 2-[(2-nitrophenyl)đithio]-1-phenyletyl (NpSSPeoc), 2-(N,N-đixyclohexylcarboxamido)etyl, t-butyl (Boc hoặc BOC), 1-đadamantyl (1-Adoc), 2-đadamantyl (2-Adoc), vinyl (Voc), alyl (Aloc hoặc alloc), 1-isopropylalyl (Ipaoc), xinamyl (Coc), 4-nitroxinamyl (Noc), 3-(3'-pyridyl)prop-2-enyl (Paloc), 8-quinolyl, và N-hydroxypiperidiny, các carbamat, cũng như các alkylđithio carbamat, kể cả metylđithio, etylđithio, isopropylđithio, t-butylđithio, và phenylđithio carbamat.

Các carbamat chứa aryl và carbamat chứa aryl đã được thể cũng là hữu ích như các carbamat benzyl, p-metoxylbenzyl, p-nitrobenzyl, p-bromobenzyl, p-clobenzyl, 2,4-điclobenzyl, 4-metylsulfinylbenzyl (MsZ), 9-anthrylmetyl, 4-metylthiophenyl (Mtpc), 1-metyl-1-(triphenylphosphonio)etyl (2-triphenylphosphonioisopropyl) (Ppoc), 2-dansyletyl (Dnseoc), 2-(4-nitrophenyl)etyl (Npeoc), 4-phenylaxetoxylbenzyl (PhAcOZ), 4-azidobenzyl (ACBZ), 4-azidometoxylbenzyl, m-clo-p-axyloxybenzyl, p-(đihydroxyboryl)-benzyl, carbobenzyloxy (Cbz), 4-benzisoxazolylmetyl (Bic), 2-(triflometyl)-6-chromonylmetyl (Troc), phenyl, và điphenylmetyl. Các carbamat bổ sung bao gồm các carbamat butynyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclopropylmetyl, 1-metylxcyclobutyl, 1-metylxcyclohexyl, 1,1-đimetylpropynyl, và 1-metyl-1-xyclopropylmetyl.

Các nhóm bảo vệ amit hữu ích đối với các amin bao gồm các amit N-formyl, N-axetyl, N-cloaxetyl, N-tricloaxetyl, N-trifloaxetyl (TFA), N-phenylaxetyl, N-3-phenylpropionyl, N-4-pentenoyl, N-picolinoyl, N-3-pyridylcarboxamido, N-benzoylphenylalanyl, N-benzoyl, và N-p-phenylbenzoyl.

Hoạt tính kháng virus

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp ức chế nhiễm virus, bao gồm việc xử lý mẫu hoặc điều trị đối tượng bị nghi ngờ nhiễm virus bằng chế phẩm

theo sáng chế.

Được xem xét trong bản mô tả này gồm các mẫu nghi chứa virus bao gồm các nguyên liệu tự nhiên hoặc nguyên liệu nhân tạo như cơ thể sống; giống cây mô hoặc giống cây tế bào; các mẫu sinh học như các mẫu nguyên liệu sinh học (các mẫu máu, huyết thanh, nước tiểu, dịch não tủy, nước mắt, nước dãi, nước bọt, mô, và nguyên liệu tương tự); các mẫu phòng thí nghiệm; các mẫu đồ ăn, nước, hoặc không khí; các mẫu sản phẩm sinh học như chiết xuất tế bào, đặc biệt là các tế bào tái tổ hợp tổng hợp glycoprotein mong muốn; và các nguyên liệu tương tự. Thông thường, mẫu này sẽ bị nghi chứa sinh vật mà gây nhiễm virus, thường là sinh vật gây bệnh như virus của khối u. Các mẫu có thể được chứa trong môi trường bất kỳ bao gồm nước và dung môi hữu cơ/nước hỗn hợp. Các mẫu bao gồm cơ thể sống như người, và các nguyên liệu nhân tạo như giống cây tế bào.

Nếu muốn, hoạt tính kháng virus của hợp chất sau khi dùng được phẩm này có thể được quan sát theo phương pháp bất kỳ bao gồm phương pháp trực tiếp và phương pháp gián tiếp phát hiện hoạt tính này. Tất cả các phương pháp định tính, định lượng, và bán định lượng xác định hoạt tính này đều được dự tính. Thông thường, một trong số các phương pháp sàng lọc nêu trên được áp dụng, tuy nhiên, phương pháp bất kỳ khác như quan sát các tính chất sinh lý của cơ thể sống cũng có thể được áp dụng.

Hoạt tính kháng virus của hợp chất có thể được đo bằng cách áp dụng quy trình sàng lọc chuẩn mà là đã biết. Ví dụ, hoạt tính kháng virus của hợp chất có thể được đo bằng cách áp dụng các quy trình chung dưới đây.

Thử nghiệm hoạt tính kháng virus đối với virus hợp bào hô hấp (RSV) và thử nghiệm độc tính đối với tế bào

Hoạt tính kháng RSV

Hoạt tính kháng virus đối với RSV được xác định bằng cách áp dụng thử nghiệm bảo vệ tế bào khỏi tác dụng gây bệnh cho tế bào do lây nhiễm ở các tế bào HEp-2. Trong thử nghiệm này, các hợp chất ức chế nhiễm và/hoặc sao chép virus sinh ra tác dụng bảo vệ tế bào kháng lại hiện tượng diệt tế bào do virus gây ra mà có thể được định lượng bằng cách sử dụng chất phản ứng sức sống của tế bào. Các kỹ thuật được áp dụng theo sáng

chế là các phương án thích ứng mới của các phương pháp đã được bộc lộ trong tài liệu đã được công bố (Chapman et al., *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(9):3346-53.)

Các tế bào HEp-2 nhận được từ ATCC (Manassas, VI) và được duy trì trong môi trường MEM có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò và penixilin/streptomycin. Các tế bào được cấy truyền hai lần một tuần và được giữ ở giai đoạn cận hợp lưu. Dung dịch gốc thương mại chứa chủng RSV A2 (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) được chuẩn độ trước khi thử nghiệm hợp chất để xác định mức độ pha loãng thích hợp của virus gốc này mà tạo ra tác dụng bảo vệ tế bào mong muốn ở các tế bào HEp-2.

Đối với thử nghiệm kháng virus, các tế bào HEp-2 được cho sinh trưởng trong bình nuôi cấy tế bào to đến gần hợp lưu nhưng chưa hoàn toàn đạt đến mức đó. Các hợp chất sẽ được thử được pha loãng sơ bộ trong DMSO trong đĩa pha loãng hợp chất loại 384 lỗ, thành 8 hoặc 40 mẫu mỗi đĩa định dạng đáp ứng liều lượng đã được chuẩn hóa. Dịch pha loãng theo bậc 3 lần của mỗi hợp chất thử nghiệm được điều chế trong các đĩa này và các mẫu thử nghiệm được chuyển qua thiết bị chuyển âm (Echo, Labcyte) ở nồng độ 100nl mỗi lỗ vào các đĩa thử nghiệm nuôi cấy tế bào loại 384 lỗ. Mỗi dịch pha loãng hợp chất được chuyển vào một mẫu hoặc bốn mẫu lặp lại trong đĩa thử nghiệm khô, mà được bảo quản cho đến khi sẵn sàng thử nghiệm. Đối chứng dương tính và đối chứng âm tính được đặt ở các đầu đối diện nhau trên đĩa trong các khối thẳng đứng (1 cột).

Sau đó, hỗn hợp gây nhiễm được điều chế bằng cách sử dụng dịch pha loãng thích hợp chứa dung dịch gốc chứa virus được xác định trước bằng cách chuẩn độ bằng các tế bào ở mật độ 50.000/ml và 20ul/lỗ được bổ sung vào các đĩa thử nghiệm có sẵn các hợp chất nhờ hệ thống tự động (uFlow, Biotek). Mỗi đĩa đều bao gồm đối chứng âm tính và đối chứng dương tính (16 bản lặp lại mỗi loại) để lần lượt tạo ra chuẩn các mức độ ức chế virus 0% và 100%. Sau khi cho nhiễm RSV, các đĩa thử nghiệm được ủ trong thời gian 4 ngày trong buồng ủ nuôi cấy tế bào ở 37°C. Sau khi ủ, chất phản ứng sức sống của tế bào, Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI) được bổ sung vào đĩa thử nghiệm, mà được ủ nhanh, và số đọc về mức độ phát quang được đo (Envision, Perkin Elmer) ở tất cả các đĩa thử nghiệm. Tác dụng gây bệnh tế bào do RSV gây ra, mức độ ức chế theo phần trăm, được xác định từ mức độ sức sống của tế bào còn lại. Các số đo này được tính đối với mỗi nồng độ được thử so với đối chứng ức chế 0% và 100%, và trị số EC₅₀ đối với mỗi

hợp chất được xác định theo hồi quy phi tuyến tính là nồng độ ức chế tác dụng gây bệnh tế bào do RSV gây ra 50%. Các hợp chất công cụ kháng RSV có tiềm năng khác nhau được dùng làm đối chứng tích cực về hoạt tính kháng virus.

Thử nghiệm gây độc tế bào ở các tế bào HEP-2

Độc tính đối với tế bào của các hợp chất đã được thử được xác định ở các tế bào HEP-2 không bị nhiễm song song với hoạt tính kháng virus bằng cách sử dụng chất phản ứng sức sống của tế bào theo cách tương tự như đã được bộc lộ trước đây đối với các loại tế bào khác (xem tài liệu: Cihlar et al., *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(2):655-65.). Quy trình xác định hoạt tính kháng virus được áp dụng để đo độc tính đối với tế bào của hợp chất chỉ khác các tế bào không nhiễm RSV. Thay vào đó, hỗn hợp tế bào không nhiễm ở cùng một mật độ được bổ sung ở nồng độ 20ul/lỗ vào các đĩa chứa các hợp chất đã được pha loãng trước, cũng ở nồng độ 100nl/mẫu. Sau đó, các đĩa thử nghiệm được ủ trong thời gian 4 ngày, tiếp theo là thử nghiệm về sức sống của tế bào bằng cách bổ sung cùng chất phản ứng CellTiter Glo và đo số đọc về mức độ phát quang. Các tế bào không được xử lý và các tế bào được xử lý bằng 2uM puromycin (do Sigma, St. Louis, MO cung cấp) được dùng lần lượt làm đối chứng sức sống của tế bào 100% và 0%. Phần trăm of sức sống của tế bào được tính đối với từng nồng độ hợp chất được thử so với các đối chứng 0% và 100% và trị số CC_{50} được xác định theo hồi quy phi tuyến tính khi nồng độ hợp chất làm giảm 50% sức sống của tế bào.

Thử nghiệm độc tính đối với tế bào ở các tế bào MT-4

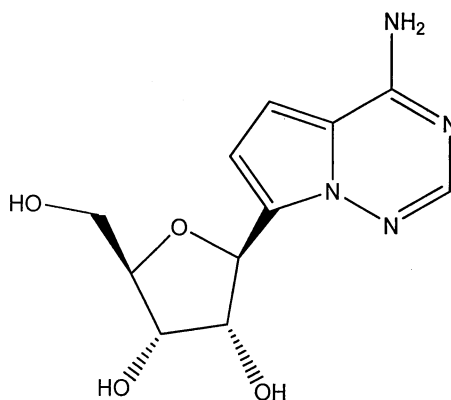
Dòng tế bào MT-4 nhận được từ chương trình chất phản ứng nghiên cứu AIDS và tham chiếu NIH (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) (Germantown, MD) và được nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, danh mục sản phẩm số # 9160) có bổ sung 10% FBS, 100 đơn vị/ml penicillin, 100 đơn vị/ml streptomycin, và 2mM L-Glutamin. Các tế bào MT-4 được cho qua hai lần mỗi tuần để duy trì mật độ tế bào thấp hơn $0,6 \times 10^6$ tế bào/ml. Môi trường RPMI-1640 hoàn chỉnh chứa 100x nồng độ hợp chất đã được pha loãng theo bậc 3 lần, nằm trong khoảng từ 26nM đến 530uM, được dán lặp lại bốn lần vào các đĩa đen loại 384 lỗ. Sau khi bổ sung hợp chất vào, 2×10^3 tế bào MT-4 được bổ sung vào từng lỗ bằng cách sử dụng dụng cụ pha chế chất lỏng MicroFlo (BioTek, Winooski, VT) và các tế bào được nuôi cấy

trong 5 ngày ở 37°C trong buồng ủ chứa 5% CO₂. Sau khi ủ, các tế bào được để cân bằng đến 25°C và sức sống của tế bào được xác định bằng cách bổ sung 25µl chất phản ứng sức sống Cell-Titer Glo. Hỗn hợp này được ủ trong thời gian 10 phút ở 25°C, và tín hiệu phát quang được định lượng trên đầu đọc đĩa Victor Luminescence. Trị số CC₅₀ được xác định là nồng độ của hợp chất mà làm giảm 50% sức sống của tế bào như được xác định theo tín hiệu trên Cell-Titer Glo. Dữ liệu được phân tích bằng cách áp dụng phần mềm Pipeline Pilot Plate Data Analytics Collection (phiên bản 7.0, Accelrys, San Diego, CA). Các trị số CC₅₀ được tính từ phân tích hồi quy phi tuyến tính bằng cách áp dụng phương trình liều lượng-đáp ứng hình xichma 4 thông số: $Y = \text{đáy} + (\text{đỉnh} - \text{đáy}) / (1 + 10^{[(\text{LogCC50} - X) * \text{độ dốc}]})$, trong đó đỉnh và đáy được ấn định lần lượt ở mức sức sống của tế bào 100% và 0%. Trị số CC₅₀ được tính ở dạng trung bình ± dao động chuẩn là của 3 thử nghiệm độc lập.

Ví dụ	EC ₅₀ / µM	HEp-2 CC ₅₀ / µM	MT-4 CC ₅₀ / µM
1	7,3	>50	>53
2	9,6	>100	>106
3	2,0	>100	>106
4	30	>50	>53
5	2,1	>50	>53
10 (PD1)	1,0	39	7,3
11 (PD2)	1,2	42	19,7
12 (PD3)	3,0	>50	27
13	10,5	>100	>106
14	40	>100	>106
15 (PD4)	1,6	35	7,9
16 (PD5)	0,3	18	25

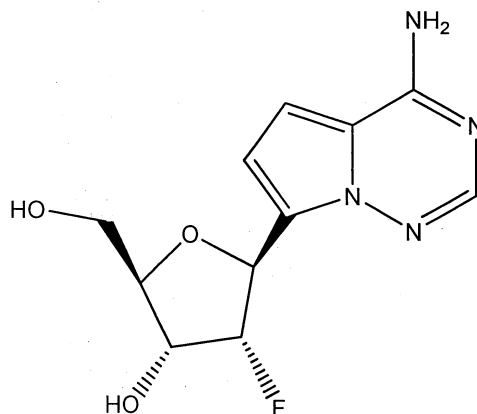
19	0,40	>44	16
20	>50	>50	
21	50	36	15
22	0,57	>100	32
23	23,5	72	21
24	1,0	>100	11
25	9,2	>100	>93
26	>50	42	>57
34 (PD6)	0,21	>50	>50
35 (PD7)	0,34	>50	47

Lợi ích khác liên quan đến ưu điểm của các hợp chất mang thay thế R^4 so với các hợp chất thiếu thay thế R^4 (tức là các hợp chất mà trong đó $R^4 = H$) về độc tính đối với tế bào MT-4. Ví dụ, hợp chất (2S,3R,4S,5R)-2-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-điol (xem tài liệu: Patil, S. A.; Otter, R. A.; Klein, R. S. Tetrahedron Lett, 1994, 35, 5339-5342), có cấu trúc:



thể hiện CC_{50} đối với MT-4 = $0,007\mu M$; trong đó các hợp chất theo các Ví dụ 1, 4, 5, 20, và 26 đều thể hiện CC_{50} đối với MT-4 $> 53\mu M$. Hơn thế nữa, hợp chất (2R,3R,4R,5S)-5-

(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (WO2012037038A1), có cấu trúc:



thể hiện CC_{50} đối với MT-4 = $30\mu M$; trong đó các hợp chất theo các Ví dụ 2, 3, 13, và 14 đều thể hiện CC_{50} đối với MT-4 $> 106\mu M$.

Lợi ích liên quan đến ưu điểm của các hợp chất mà $R^3 = F$ mang thay thế R^4 so với các hợp chất không mang thay thế R^4 (tức là các hợp chất trong đó $R^4 = H$) về hoạt tính kháng RSV của HEP-2. Ví dụ, hợp chất (2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (WO2012037038A1) có cấu trúc nêu trên có trị số EC_{50} của HEP-2 $= > 100\mu M$; trong đó các hợp chất theo các ví dụ 2, 3, 13, 14, 19, 21, 22, 23, và 24 đều thể hiện $EC_{50} = < 100\mu M$.

Điều chế RSV RNP

Các phức RSV ribonucleoprotein (RNP) được điều chế theo phương pháp được cải biến từ Mason et al (1). Các tế bào HEP-2 được cấy vào đĩa ở mật độ $7,1 \times 10^4$ tế bào/cm² trong MEM + 10% huyết thanh bào thai bò (FBS) và để bám qua đêm ở 37°C (5% CO₂). Sau khi bám, các tế bào được chuyển nhiễm với RSV A2 (MOI=5) trong 35ml MEM + 2% FBS. Tại thời điểm 20 giờ sau khi nhiễm, môi trường được thay bằng MEM + 2% FBS có bổ sung actinomycin D ở nồng độ $2\mu g/ml$ và đưa trở lại 37°C trong thời gian một giờ. Sau đó, các tế bào được rửa một lần bằng PBS và xử lý bằng 35ml PBS + $250\mu g/ml$ lyso-lexitin trong thời gian một phút, sau đó toàn bộ chất lỏng được hút đi. Các tế bào được thu gom bằng cách bỏ chúng vào 1,2ml dung dịch đệm A [50mM Tris axetat (độ pH = 8,0), 100mM kali axetat, 1mM DTT và $2\mu g/ml$ actinomycin D] và được phân giải bằng cách cho lặp lại qua kim cỡ 18 (10 lần). Dịch phân giải tế bào được đưa vào

nước đá trong thời gian 10 phút và sau đó được ly tâm ở tốc độ 2400g trong thời gian 10 phút ở 4°C. Dịch nổi (S1) được loại bỏ và viên (P1) được phá vỡ trong 600ul dung dịch đệm B [10mM Tris axetat (độ pH =8,0), 10mM kali axetat và 1,5mM MgCl₂] có bổ sung 1% Triton X-100 bằng cách cho lặp lại qua kim cỡ 18 (10 lần). Viên đã được tạo huyền phù lại được đưa vào nước đá trong thời gian 10 phút và sau đó được ly tâm ở 2400g trong thời gian 10 phút ở 4°C. Dịch nổi (S2) được loại bỏ và viên (P2) bị phá vỡ trong 600ul dung dịch đệm B có bổ sung 0,5% deoxycholat và 0,1% Tween 40. Viên đã được tạo huyền phù lại được đưa vào nước đá trong thời gian 10 phút và sau đó được ly tâm ở 2400g trong thời gian 10 phút ở 4°C. Phân đoạn dịch nổi (S3), chứa phức RSV RNP đã được làm giàu, được gom và nồng độ protein được xác định theo mức độ hấp thụ tia cực tím ở 280nm. Các phân đoạn RSV RNP S3 được bảo quản ở -80°C.

Thử nghiệm RSV RNP

Các hỗn hợp phản ứng phiên mã chứa 25µg phức RSV RNP thô trong 30µl dung dịch đệm phản ứng [50mM Tris-axetat (độ pH =8,0), 120mM kali axetat, 5% glyxerol, 4,5mM MgCl₂, 3mM DTT, 2mM axit etylenglycol-bis(2-aminoetylether)-tetraaxetic (EGTA), 50µg/ml BSA, 2,5U RNasin (Promega), ATP, GTP, UTP, CTP và 1,5uCi [α -³²P] NTP (3000Ci/mmol)]. Nucleotit đã được đánh dấu phóng xạ được dùng trong thử nghiệm phiên mã được chọn để khớp chất tương tự nucleotit được đánh giá về mức độ ức chế phiên mã RSV RNP. NTP cạnh tranh lạnh được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng một nửa K_m của nó (ATP= 20µM, GTP= 12,5µM, UTP= 6µM và CTP= 2µM). Ba nucleotit còn lại được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng 100µM.

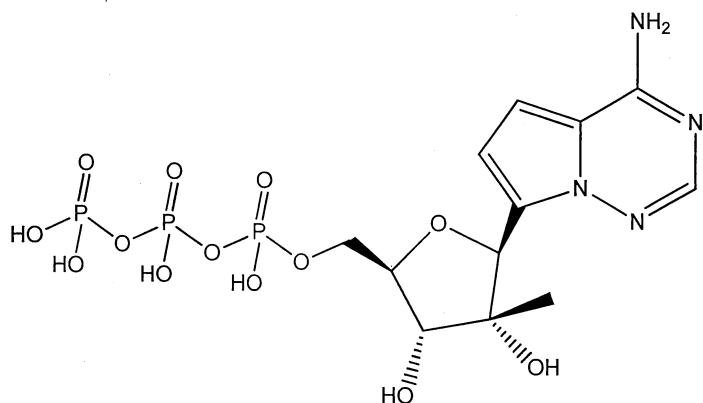
Để xác định xem liệu các chất tương tự nucleotit có ức chế phiên mã RSV RNP hay không, các hợp chất được bổ sung vào bằng cách áp dụng quy trình pha loãng theo bậc gồm 6 bước với mức gia tăng 5 lần. Sau 90 phút ủ ở 30°C, các phản ứng RNP được dừng bằng 350µl dung dịch đệm phân giải Qiagen RLT và ARN được tinh chế bằng cách sử dụng kit Qiagen RNeasy 96. ARN tinh khiết được làm biến tính trong dung dịch đệm nạp mẫu ARN (do Sigma cung cấp) ở 65°C trong thời gian 10 phút và chạy trên gel 1,2% agarosa/MOPS chứa 2M formaldehyt. Gel agarosa này được làm khô và được phơi màn hình phospho Storm và được hiện hình bằng cách sử dụng thiết bị hình phospho Storm (do GE Healthcare cung cấp). Nồng độ của hợp chất mà làm giảm 50% tổng sản phẩm

phiên mã đã được đánh dấu phóng xạ (IC_{50}) được tính theo phân tích hồi quy phi tuyến tính đối với hai lần lặp lại.

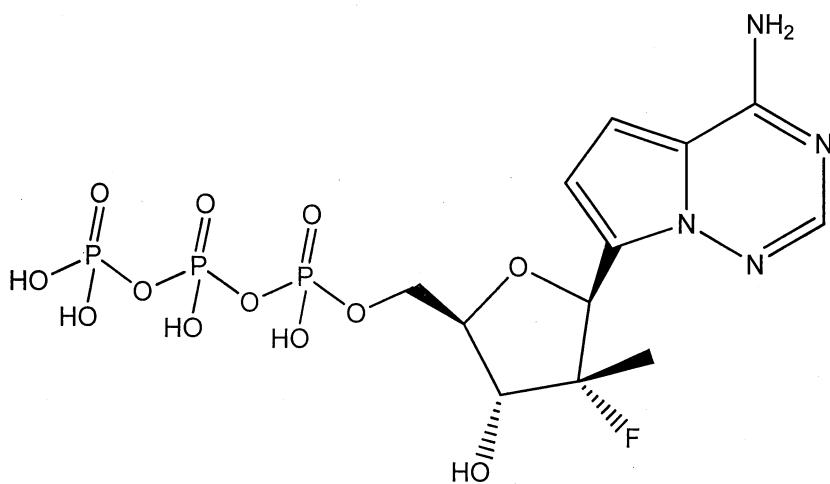
Tài liệu tham khảo Mason, S., Lawetz, C., Gaudette, Y., Do, F., Scouten, E., Lagace, L., Simoneau, B. and Liuzzi, M. (2004) Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial virus RNA transcriptase activity and identification. *Nucleic Acids Research*, 32, 4758-4767.

Ví dụ	$IC_{50} / \mu M$
6 (TP1)	0,086
7 (TP2)	1
8 (TP3)	0,025
9 (TP4)	0,12
17 (TP5)	0,56
18 (TP6)	0,42
27 (TP7)	0,097
28 (TP8)	0,086
29 (TP9)	0,080
30 (TP10)	
31 (TP11)	
32 (TP12)	0,022
33 (TP13)	

Cơ sở xem xét tiếp theo liên quan đến ưu điểm rằng các hợp chất làm ví dụ thể hiện tiềm năng ức chế phiên mã RSV RNP so với các hợp chất có thay thế 2' CMe. Ví dụ, ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-đihydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat (WO2008089105A2, và WO2010002877A2), có cấu trúc:



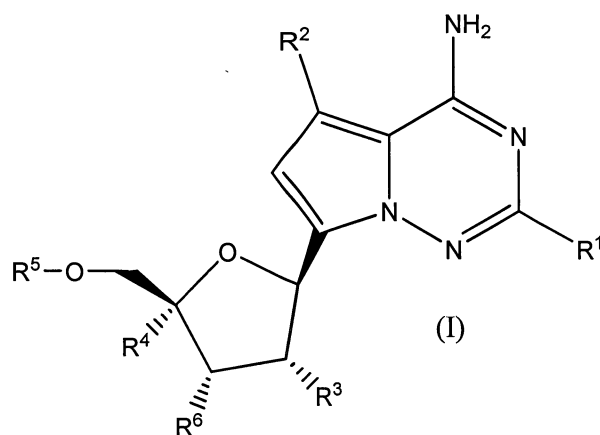
thể hiện $IC_{50} = 8,5\mu\text{m}$; trong khi đó hợp chất theo Ví dụ TP3 thể hiện $IC_{50} = 0,025\mu\text{m}$. Hơn thế nữa, hợp chất ((2R,3R,4R,5S)-5-(4-aminopyrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metyl tetrahydrogen triphosphat (WO 2011035231 A1), có cấu trúc:



thể hiện $IC_{50} = >100\mu\text{M}$; trong đó hợp chất theo Ví dụ TP1 thể hiện $IC_{50} = 0,086\mu\text{M}$ và hợp chất theo Ví dụ TP2 thể hiện $IC_{50} = 1\mu\text{M}$.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó:



trong đó:

R^1 là H hoặc F;

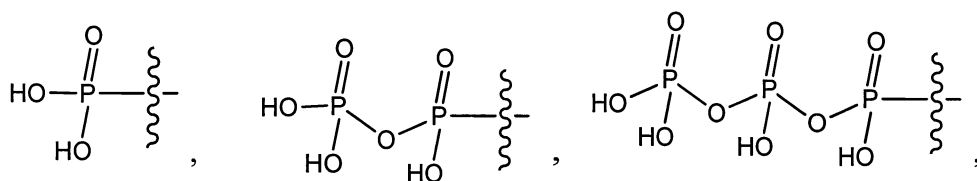
R^2 là H hoặc F;

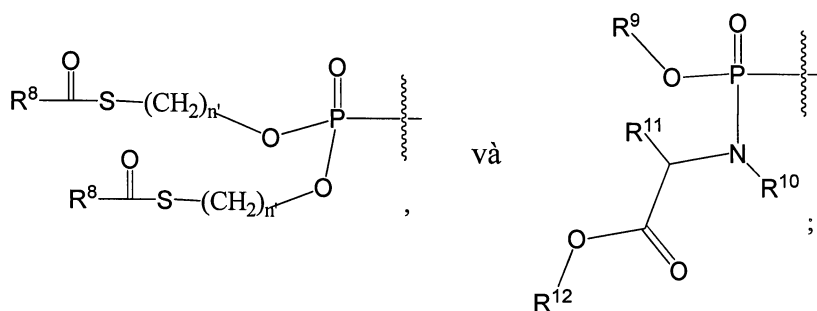
R^3 là OH hoặc F;

R^4 là CN, C_1 - C_4 alkyl, C_2 - C_4 alkenyl, C_2 - C_4 alkynyl, C_3 - C_4 xycloalkyl, azido, halogen, hoặc C_1 - C_2 haloalkyl;

R^6 là OH; và

R^5 được chọn từ nhóm gồm H và:



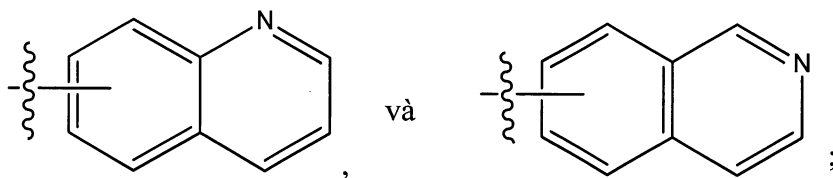


trong đó:

n' được chọn từ 1, 2, 3, và 4;

R^8 được chọn từ C_1 - C_8 alkyl, $-O$ - C_1 - C_8 alkyl, benzyl, $-O$ -benzyl, $-CH_2$ - C_3 - C_6 xycloalkyl, $-O$ - CH_2 - C_3 - C_6 xycloalkyl, và CF_3 ;

R^9 được chọn từ phenyl, 1-naphtyl, 2-naphtyl,

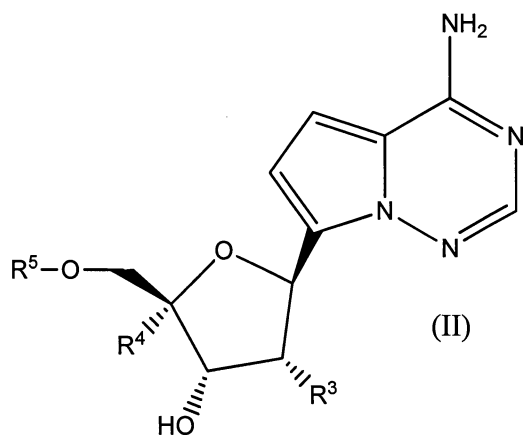


R^{10} được chọn từ H và CH_3 ;

R^{11} được chọn từ H và C_1 - C_6 alkyl; và

R^{12} được chọn từ H, C_1 - C_8 alkyl, benzyl, C_3 - C_6 xycloalkyl, và $-CH_2$ - C_3 - C_6 xycloalkyl.

2. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^1 là H.
3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^2 là H.
4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc muối được dụng của nó, có công thức (II):

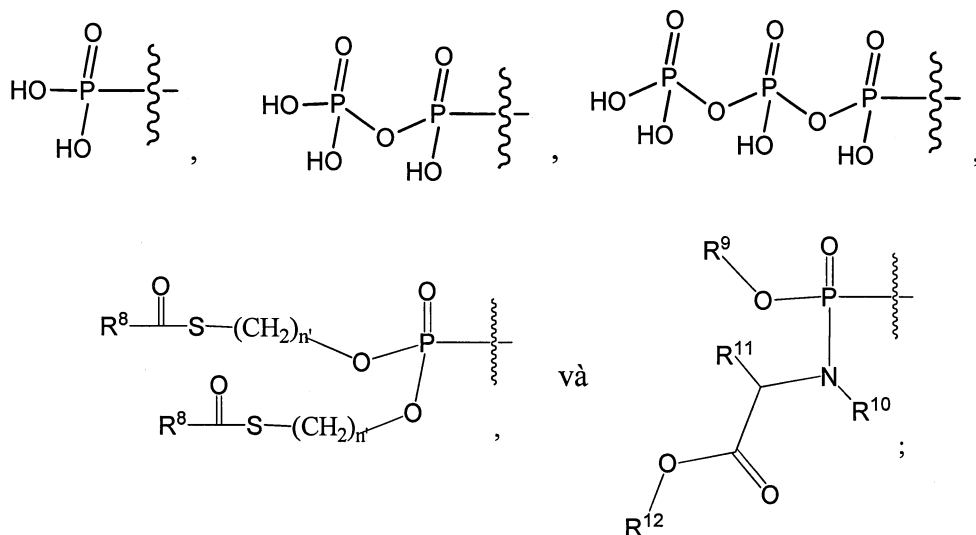


trong đó:

R^3 là OH hoặc F;

R^4 là CN, C_1 - C_4 alkyl, C_2 - C_4 alkenyl, C_2 - C_4 alkynyl, C_3 - C_4 xycloalkyl, azido, halogen, hoặc C_1 - C_2 haloalkyl; và

R^5 được chọn từ nhóm gồm H và:



trong đó:

n' được chọn từ 1, 2, 3, và 4;

R^8 được chọn từ C_1 - C_8 alkyl, - O - C_1 - C_8 alkyl, benzyl, - O -benzyl, - CH_2 - C_3 - C_6 xycloalkyl, - O - CH_2 - C_3 - C_6 xycloalkyl, và CF_3 ;

R^9 là phenyl;

R^{10} được chọn từ H và CH_3 ;

R^{11} được chọn từ H và C_1-C_6 alkyl; và

R^{12} được chọn từ H, C_1-C_8 alkyl, benzyl, C_3-C_6 xycloalkyl, và $-CH_2-C_3-C_6$ xycloalkyl.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^4 là CN, metyl, etyl, etenyl, etynyl, azido, F, Cl, $-CH_2Cl$, $-CH_2F$, $-CHF_2$, hoặc $-CF_3$.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^3 là F.

7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^3 là OH.

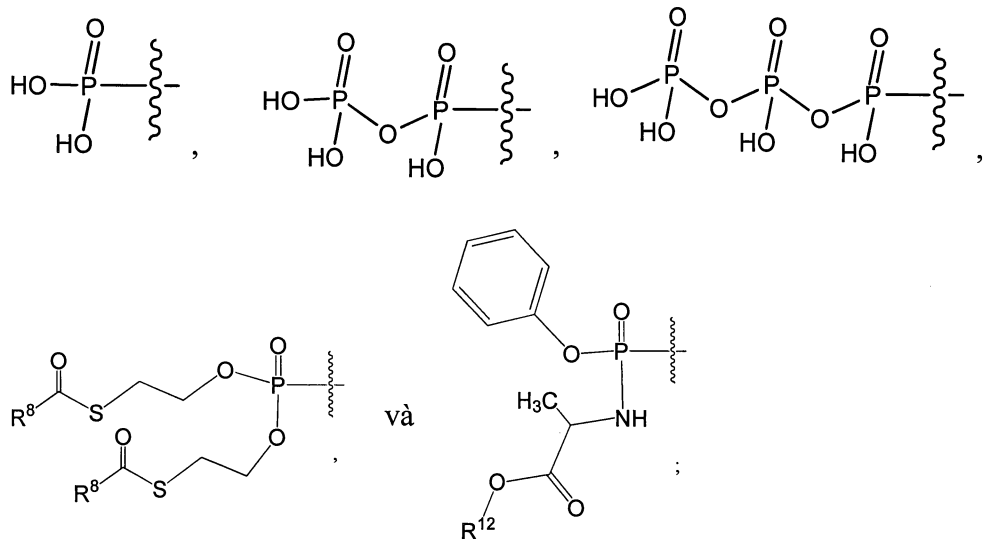
8. Hợp chất theo điểm 4, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^4 là CN.

9. Hợp chất theo điểm 4, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^4 là metyl, etyl, vinyl, hoặc etynyl.

10. Hợp chất theo điểm 6 hoặc 7, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^4 là halometyl.

11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^5 là H.

12. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R^5 được chọn từ nhóm bao gồm:



trong đó:

R⁸ được chọn từ C₁-C₈ alkyl, -O-C₁-C₈ alkyl, benzyl, và -CH₂-C₃-C₆ xycloalkyl; và

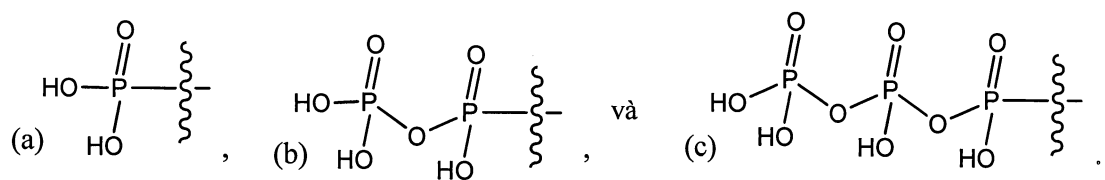
R¹² được chọn từ C₁-C₈ alkyl, benzyl, C₃-C₆ xycloalkyl, và -CH₂-C₃-C₆ xycloalkyl.

13. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

- (A) R⁸ là C₁-C₈ alkyl; hoặc
- (B) R⁸ là C₁-C₆ alkyl; hoặc
- (C) R⁸ là C₁-C₅ alkyl; hoặc
- (D) R⁸ là C₁-C₄ alkyl; hoặc
- (E) R¹² là C₁-C₈ alkyl; hoặc
- (F) R¹² là C₁-C₄ alkyl.

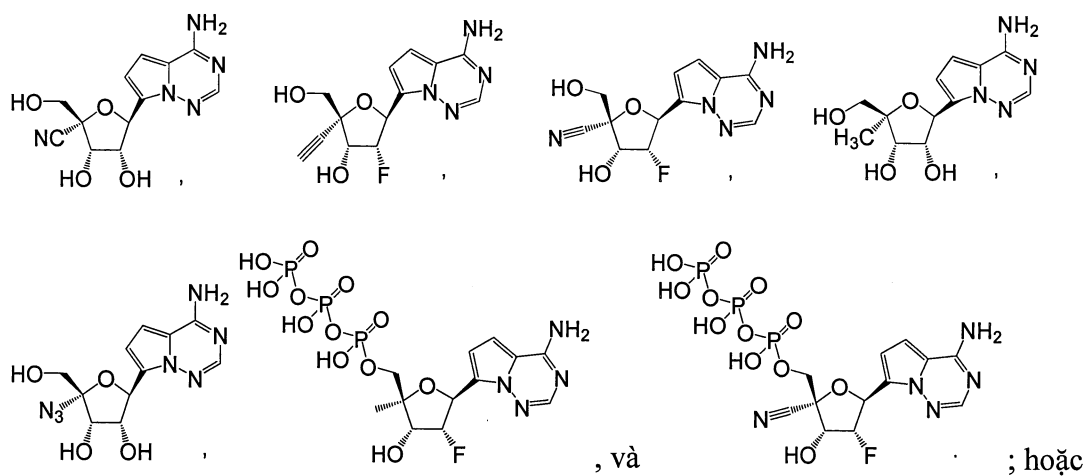
14. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6, 8 và 9, hoặc muối được dụng của nó, trong đó khi R³ là F thì R⁴ không là metyl.

15. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc muối được dụng của nó, trong đó R⁵ được chọn từ nhóm gồm H và:

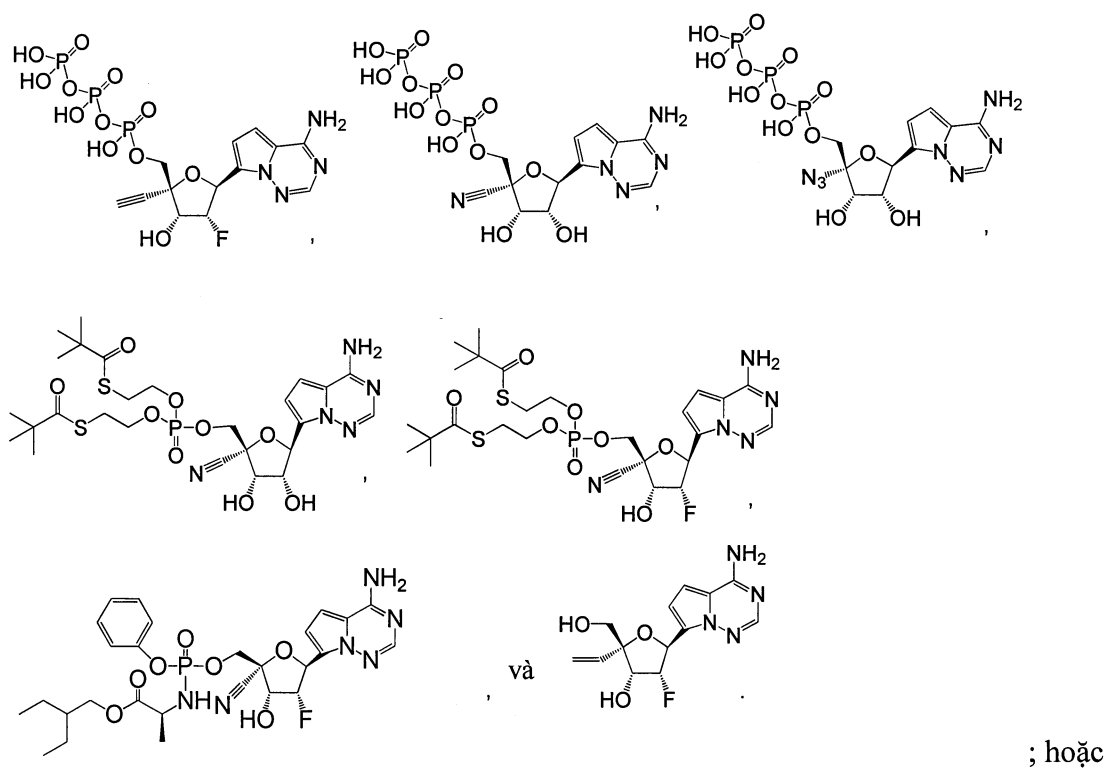


16. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dựng của nó, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:

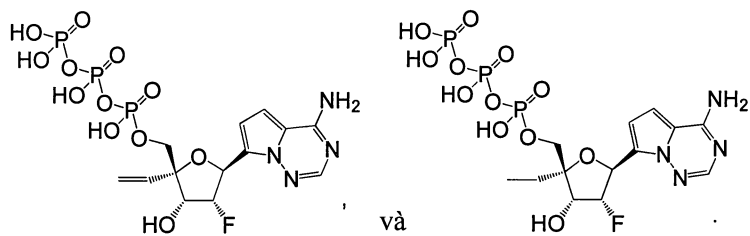
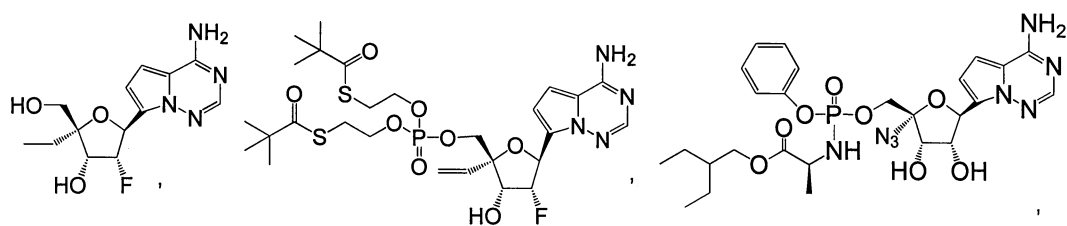
(A)



(B)

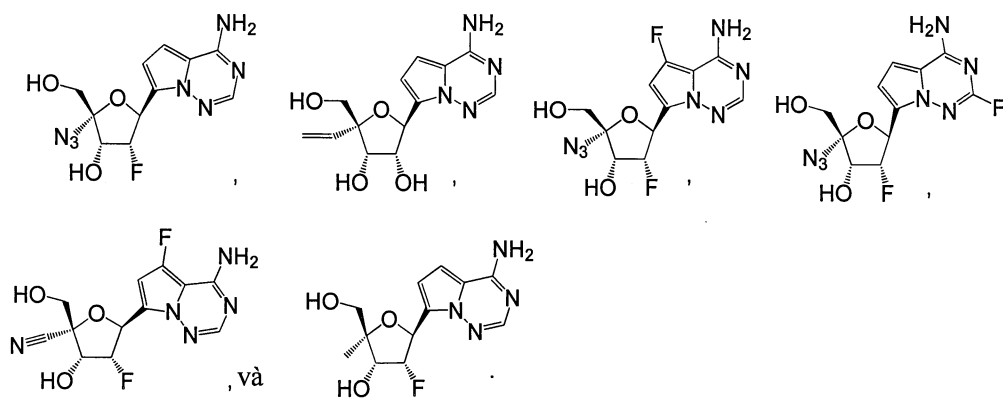


(C)



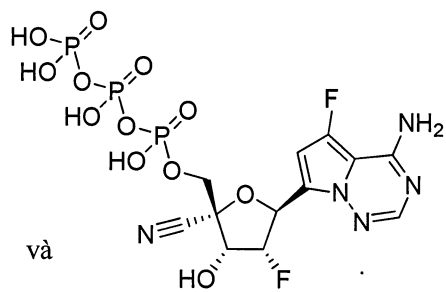
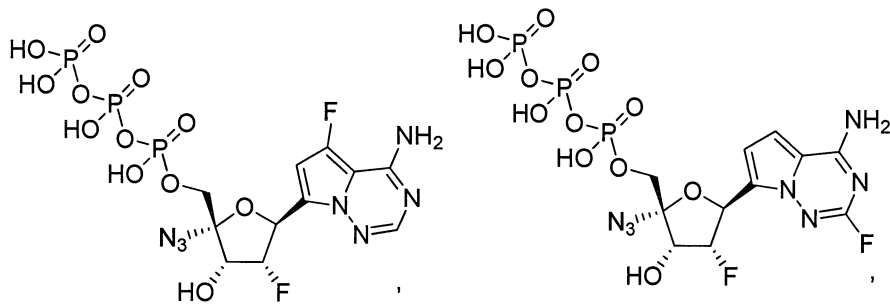
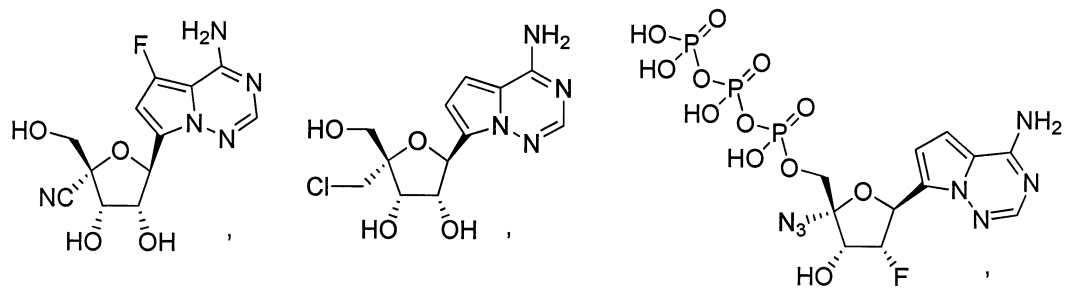
; hoặc

(D)



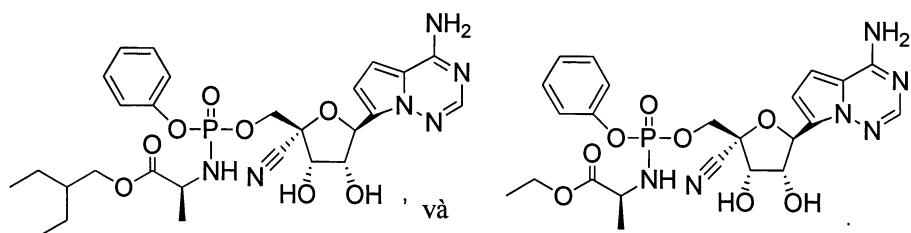
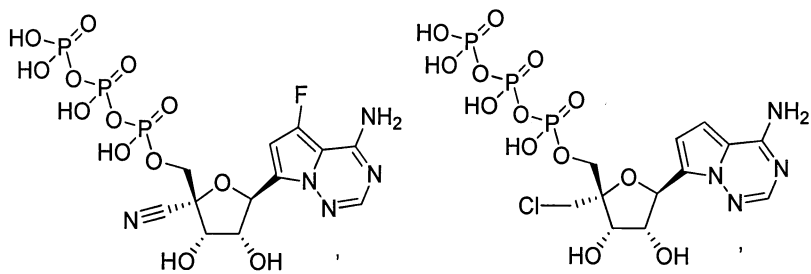
; hoặc

(E)



; hoặc

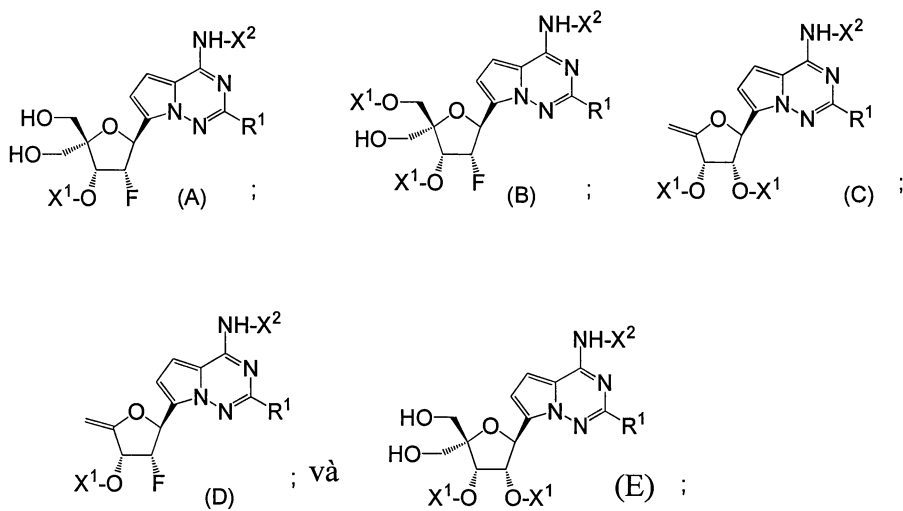
(F)



17. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu về mặt dược tính của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang dược dụng hoặc tá dược.

18. Hợp chất được chọn từ:

(i) công thức (A), công thức (B), công thức (C), công thức (D), và công thức (E):



trong đó R^1 là H hoặc F; X^1 là nhóm bảo vệ oxy mà là:

nhóm bảo vệ silyl ete được chọn từ trimethylsilyl (TMS), triethylsilyl (TES), dimethylisopropylsilyl (IPDMS), diethylisopropylsilyl (DEIPS), dimethylhexylsilyl (TDS), t-butylđimethylsilyl (TBS hoặc TBDMS), t-butylđiphenylsilyl (TBDPS), tribenzylsilyl, tri-p-xylylsilyl, triisopropylsilyl (TIPS), diphenylmethylsilyl (DPMS), di-t-butylmethylsilyl (DTBMS), triphenylsilyl (TPS), methylđiphenylsilyl (MDPS), t-butylmethoxyphenylsilyl, tris(trimethylsilyl)silyl (sisyl), (2-hydroxystyryl)đimethylsilyl (HSDMS), (2-hydroxystyryl)-điisopropylsilyl (HSDIS). t-butylmethoxyphenylsilyl (TBMPS) và t-butoxyđiphenylsilyl (DPTBOS); hoặc

nhóm bảo vệ kiểu benzyl được chọn từ benzyl, benzyl đã được halogen hóa, p-methoxybenzyl, benzyloxymethyl, 2,4-đimethoxybenzyl, 3,4-đimethoxybenzyl, 2,6-đimethoxybenzyl, p-CF₃-benzyl, p-methylbenzyl, p-methoxybenzyl, 3,5-đimethylbenzyl, p-tert-butylbenzyl, o-nitrobenzyl, p-nitrobenzyl, p-halobenzy, kể cả p-Br-benzyl, 2,6-diclobenzyl, p-xyanobenzy, p-phenylbenzyl, 2,6-điflobenzyl, p-axylaminobenzy (PAB), p-azidobenzy

(AzB), 4-azido-3-clobenzyl, 2-triflometylbenzyl, p-(metylsulfinyl)benzyl, 2-picolyl, 4-picolyl, 3-metyl-2-picolyl N-oxido, 2-quinolinylmetyl, điphenylmetyl (DPM), p,p'-đinitrobenzhydryl, triphenylmetyl, alpha-naphthylđiphenylmetyl, p-metoxypheylđiphenylmetyl, đip(metoxypheyl)phenylmetyl, tri(p-metoxypheyl)metyl, 4,4',4''-tris-(benzoyloxyphenyl)metyl, và 2-naphthylmetyl;

và X² là nhóm bảo vệ amin mà:

được chọn từ p-metoxycarbonyl (Moc hoặc MeOZ), axetyl (Ac), benzoyl (Bz), p-metoxycarbonyl (PMB), 3,4-đimethoxycarbonyl (DMPM), p-metoxypheyl (PMP), tosyl (Ts hoặc Tos), trifloaxetamid và trityl; hoặc

là nhóm bảo vệ carbamat được chọn từ 9-florenylmetyloxycarbonyl (Fmoc), 9-(2-sulfo)florenylmetyl, 9-(2,7-đibromo)florenylmetyl, 17-tetrabenzo[a,c,g,i]florenylmetyl (Tbfmoc), 2-clo-3-inđenylmetyl (Climoc), benz[f]inđen-3-ylmetyl (Bimoc), 2,7-đi-t-butyl[9-(10,10-đioxo-10,10,10-tetrahydrothioxanyl)]metyl (DBD-Tmoc), [2-(1,3-đithianyl)metyl (Dmoc), 1,1-đioxobenzo[b]thiophen-2-ylmetyl (Bsmoc), 1,1-đimetyl-2-xyanoetyl, 2-phosphonioetyl (Peoc), 2-metylthioetyl, 2-(p-toluensulfonyl)etyl, 2,2,2-tricloetyl (Troc), 2-(trimetylsilyl)etyl (Teoc), 2-phenyleetyl (hZ), 1-(1-adamantyl)-1-metyetyl (Adpoc), 1,1-đimetyl-2-bromoetyl, 1,1-đimetyl-2-cloetyl, 1,1-đimetyl-2,2-đibromoetyl (DB-t-BOC), 1,1-đimetyl-2,2,2-trichloroetyl (TCBOC), 1-metyl-1-(4-biphenyl)etyl (Bpoc), 1-(3,5-đi-t-butylphenyl)-1-metyetyl (t-Bumeoc), 2-(2'pyridyl)etyl, 2-(4'pyridyl)etyl, 2,2-bis(4'-nitrophenyl)etyl (Bnpeoc), N-(2-pivaloylamino)-1,1,đimetyetyl, 2-[(2-nitrophenyl)đithio]-1-phenyleetyl (NpSSPeoc), 2-(N,N-đixyclohexylcarboxamido)etyl, t-butyl (Boc or BOC), 1-adamantyl (1-Adoc), 2-adamantyl (2-Adoc), vinyl (Voc), allyl (Aloc hoặc alloc), 1-isopropylallyl (Ipaoc), xinnamyl (Coc), 4-nitroxinnamyl (Noc), 3-(3'-pyridyl)prop-2-enyl (Paloc), 8-quinolyl, N-hydroxypiperidinyl, metylđithio, etylđithio, isopropylđithio, t-butylđithio, phenylđithio, benzyl, p-metoxycarbonyl, p-nitrobenzyl, p-bromobenzyl, p-clobenzyl, 2,4-điclobenzyl, 4-metylsulfinylbenzyl (Msz), 9-anthrylmetyl, 4-metylthiophenyl (Mtpc), 1-metyl-1-(triphenylphosphonio)etyl (2-triphenylphosphonioisopropyl) (Ppoc), 2-đansyleetyl (Dnseoc), 2-(4-nitrophenyl)etyl (Npeoc), 4-phenylaxetoxycarbonyl (PhAcOZ), 4-azidobenzyl (ACBZ), 4-azidometoxycarbonyl, m-clo-p-axyloxybenzyl, p-(đihydroxyboryl)benzyl, carbobenzyloxy (Cbz), 4-benzisoxazolylmetyl (Bic), 2-(triflometyl)-6-chromonylmetyl (Tcroc), phenyl, điphenylmetyl, butynyl, xyclo-

pentyl, xyclohexyl, xyclopropylmetyl, 1-metylxclobutyl, 1-metylxclohexyl, 1,1-đi-metylpropynyl, và 1-metyl-1-xyclopropylmetyl carbamat;

hoặc nhóm bảo vệ amit cho các amin được chọn từ N-formyl, N-axetyl, N-cloaxetyl, N-tricloaxetyl, N-trifloaxetyl (TFA), N-phenylaxetyl, N-3-phenylpropionyl, N-4-pentenoyl, N-picolinoyl, N-3-pyridylcarboxamido, N-benzoylphenylalanyl, N-benzoyl, và N-p-phenylbenzoyl amit; hoặc

(ii) nhóm gồm các hợp chất có công thức:

