



(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)



1-0028701

(51)⁷ C07D 493/14; A61K 31/122; A61K
31/336

(13) B

(21) 1-2015-04418

(22) 17/04/2014

(86) PCT/AU2014/050018 17/04/2014

(87) WO 2014/169356 23/10/2014

(30) 2013901359 18/04/2013 AU

(45) 25/06/2021 399

(43) 26/09/2016 342A

(73) QBIOTICS LIMITED (AU)

7 Penda Street, Yungaburra, Queensland 4872, Australia

(72) REDDELL, Paul Warren (AU); GORDON, Victoria Anne (AU); MOSELEY, Ryan (GB); STEADMAN, Robert (GB); MOSES, Rachael Louise (GB); BOYLE, Glen Mathew (AU); PARSONS, Peter Gordon (AU).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT EPOXY-TIGLIAN DÙNG ĐỂ LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất epoxy-tiglian và dược phẩm chứa hợp chất này. Theo các phương án cụ thể, hợp chất epoxy-tiglian ở dạng hợp chất epoxy-tigliaen-3-on. Sáng chế cũng mô tả phương pháp kích thích hoặc thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cũng như phương pháp làm giảm sự hình thành sẹo và cải thiện hiệu quả thẩm mỹ nhờ vào sự làm lành vết thương. Sáng chế cũng mô tả hợp chất và chế phẩm sử dụng để làm lành vết thương.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất epoxy-tiglian để thúc đẩy quá trình làm lành vết thương và được phẩm chứa hợp chất này. Theo các phương án cụ thể, hợp chất epoxy-tiglian là ở dạng hợp chất epoxy-tigliaen-3-on. Sáng chế mô tả phương pháp kích thích hoặc thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cũng như phương pháp làm giảm sự hình thành sẹo và cải thiện hiệu quả thẩm mỹ khi làm lành vết thương. Sáng chế cũng mô tả hợp chất và chế phẩm để sử dụng trong việc làm lành vết thương.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quá trình làm lành vết thương là một quá trình phức tạp trong đó da hoặc cơ quan hoặc mô khác, tự hồi phục sau tổn thương. Trên da bình thường, biểu bì (lớp ngoài cùng) và chân bì (lớp bên trong hoặc sâu hơn) tồn tại ở trạng thái cân bằng ổn định, tạo thành hàng rào bảo vệ chống lại môi trường bên ngoài. Ngay khi hàng rào bảo vệ bị phá vỡ, quá trình sinh lý bình thường của quá trình làm lành vết thương ngay lập tức bắt đầu hoạt động. Mô hình làm lành vết thương cổ điển được chia thành ba giai đoạn không trùng nhau, tuần tự, cụ thể là: giai đoạn viêm, giai đoạn tăng sinh và cuối cùng là giai đoạn tái tạo.

Trong giai đoạn viêm của quá trình làm lành vết thương, xuất hiện sự bổ sung hoạt hóa các bạch cầu trung tính và tiếp đó là bạch cầu đơn nhân to từ hệ mạch bao quanh vào trong vết thương. Bạch cầu trung tính về cơ bản để khống chế và phá hủy ban đầu các lây nhiễm do vi khuẩn và nấm trong vết thương. Bạch cầu đơn nhân to trưởng thành thành đại thực bào khi chúng xâm nhập vào vết thương, nơi chúng có nhiều vai trò trong quá trình xử lý vết thương bao gồm cả quá trình thực bào ban đầu và làm sạch chất nền và mảnh vụn tế bào. Sự giải phóng các enzym, xytokin và các yếu tố tăng trưởng bằng cả bạch cầu trung tính và đại thực bào trong vết thương tiếp theo có thể gây ra ảnh hưởng mạnh đối với các tế bào khác trong vết thương và mô

bao quanh. Ví dụ, đại thực bào tiết ra collagenaza để loại bỏ mô hoại tử vết thương; interleukin và yếu tố hoại tử khối u (TNF), kích thích các nguyên bào sợi và thúc đẩy sự tạo mạch; và yếu tố tăng trưởng biến đổi (TGF), yếu tố này kích thích các tế bào sừng. Chúng cũng tiết ra yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu và yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu, yếu tố này khởi đầu sự hình thành mô hạt và do đó khởi đầu quá trình chuyển đổi sang giai đoạn tăng sinh và tái tạo. Giai đoạn viêm nhanh chóng và mạnh mẽ nhưng thoáng qua thường có liên quan đến hiệu quả làm lành vết thương tốt.

Giai đoạn thứ hai của quá trình làm lành vết thương có liên quan đến sự tăng sinh tế bào và sự di trú và sự co lại vết thương. Điều này có liên quan đến các tác dụng được thực hiện bởi các tế bào bên trong vết thương để đạt được sự kín miệng vết thương và làm đầy lại mô bị mất. Sự di trú và tăng sinh của các tế bào sừng là cơ bản để tái tạo biểu mô của vết thương, trong khi việc tái tạo lại lớp chân bì bên dưới là kết quả của sự di trú, tăng sinh và biệt hóa của các nguyên bào sợi giúp vết thương khép lại và góp phần tổng hợp, bố và liên kết các sợi collagen.

Trong giai đoạn tái tạo cuối cùng, các tế bào sừng di trú và tăng sinh ở rìa vết thương phân tầng lại để bịt kín vết thương và tạo thành một lớp biểu bì liên tục. Trong giai đoạn này, nhiều thay đổi cũng xuất hiện trong chân bì liên quan đến việc tái tạo chất nền ngoại bào để khôi phục lại cấu trúc bình thường của lớp da và hệ mạch.

Trong một số trường hợp, vết thương có thể chậm lành hoặc hoàn toàn không lành. Nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình làm lành vết thương, ví dụ, sức khỏe chung của đối tượng bị thương, độ tuổi của đối tượng bị thương, các bệnh như bệnh đái tháo đường, hoặc các bệnh khác mà có thể ảnh hưởng đến sự tuần hoàn, sự xuất hiện nhiễm khuẩn, dị vật hoặc mô hoại tử, hoặc trong một số trường hợp, việc sử dụng thuốc có thể ảnh hưởng đến tốc độ làm lành vết thương.

Hơn nữa, ở một số vết thương, việc điều chỉnh sự tiêu sưng vết thương không hoàn toàn có thể dẫn đến chứng xơ hóa và sự hình thành sẹo quá mức để lại mô sẹo kém hơn về mặt chức năng và thẩm mỹ so với mô bình thường.

Có nhiều nghiên cứu về việc cải thiện quá trình làm lành vết thương và làm giảm mô sẹo. Tuy nhiên, cần phải tìm ra các tác nhân có khả năng thúc đẩy quá trình làm lành vết thương, ví dụ, làm tăng tốc độ làm lành vết thương, đặc biệt là các vết thương mạn tính. Cũng cần đến các tác nhân cho phép vết thương lành lại với ít sẹo hơn so với tự nhiên.

Hợp chất epoxy-tiglian đã được phát hiện có ứng dụng điều trị bệnh làm tác nhân gây độc tế bào, tác nhân kháng nguyên sinh động vật, tác nhân diệt ký sinh trùng và thuốc kháng sinh (WO2007/070985) cũng như ứng dụng trong nông nghiệp, ví dụ, làm tác nhân phòng trừ loài gây hại (WO2007/070985) hoặc dưới dạng tác nhân xén lông hóa học (AU 2010200429). Tuy nhiên, không có tài liệu nào gợi ý rằng các hợp chất như vậy sẽ thúc đẩy quá trình làm lành vết thương.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất dựa trên sự phát hiện ra chất chiết từ thực vật, ít nhất một phần, có chứa các hợp chất epoxy-tiglian có thể thúc đẩy quá trình làm lành vết thương và cũng làm giảm mô sẹo hình thành khi vết thương lành lại.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế mô tả phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cho một đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng hợp chất epoxy-tiglian hoặc muối được dụng của nó.

Theo một số phương án, hợp chất epoxy-tiglian có dạng chất chiết thực vật, đặc biệt là chất chiết etanolic. Theo một số phương án, chất chiết thực vật có thể thu được hoặc được thu từ thực vật là loài *Fontainea* hoặc loài *Hylandia*. Theo một số phương án, hợp chất epoxy-tiglian được phân lập từ chất chiết thực vật. Theo các

phương án khác, hợp chất epoxy-tiglian là dẫn xuất tổng hợp hoặc bán tổng hợp của hợp chất tiglian được phân lập.

Theo một số phương án, phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương bao gồm bước làm tăng tốc độ làm lành vết thương. Theo một số phương án, phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương bao gồm bước làm giảm sự hình thành sẹo trong mô vết thương. Theo một số phương án, phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương bao gồm cả bước làm tăng tốc độ làm lành vết thương và bước làm giảm sự hình thành sẹo trong mô vết thương. Theo một số phương án, vết thương là vết thương mạn tính, vết thương cấp tính hoặc vết thương hiện có.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn chặn sự hình thành sẹo quá mức bao gồm bước bôi hợp chất epoxy-tiglian hoặc muối được dụng của nó lên vết thương hoặc sẹo.

Theo một số phương án, sự hình thành sẹo quá mức là sự hình thành sẹo lồi hoặc sẹo phì đại.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất epoxy-tiglian hoặc muối được dụng của nó để sản xuất thuốc để thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cho đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất epoxy-tiglian hoặc muối được dụng của nó để thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cho đối tượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình biểu diễn bằng ảnh chụp sự làm kín miệng vết xước trong các tế bào nguyên bào sợi mới sinh ở người được điều trị bằng đối chứng chỉ có chất mang, 24 giờ sau khi có vết xước.

Fig. 2 là hình biểu diễn bằng ảnh chụp sự làm kín miệng vết xước trong tế bào nguyên bào sợi mới sinh ở người được điều trị bằng 30 ng/mL Hợp chất 1, 24 giờ sau khi có vết xước.

Fig. 3 là hình biểu diễn bằng đồ thị của thử nghiệm xâm lấn matrigel của tế bào nguyên bào sợi mới sinh ở người được điều trị bằng 10 ng/mL hoặc 30 ng/mL Hợp chất 1 so với đối chứng chỉ có chất mang. Các tế bào được đếm sau thời gian 24 giờ ủ. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Fig. 4 là thử nghiệm Western blot của tế bào nguyên bào sợi mới sinh ở người được điều trị bằng Hợp chất 1 và thể hiện sự hoạt hóa và sự điều hòa giảm sau đó của các phân tử truyền tín hiệu chính có liên quan đến sự sửa chữa và làm lành vết thương.

Fig. 5 là hình biểu diễn bằng ảnh chụp các tác động của sự phơi nhiễm các nguyên bào sợi (được nuôi cấy với sự có mặt của TGF- β 1) đến khoảng nồng độ của hợp chất 1 đối với sự biệt hóa thành u nguyên bào sợi, được đặc trưng bởi sự biểu hiện tăng của actin cơ trơn α và sự hình thành sợi stress.

Fig. 6 là hình biểu diễn bằng ảnh chụp về các tác động của sự phơi nhiễm các nguyên bào sợi (được nuôi cấy với sự có mặt của TGF- β 1) đến khoảng nồng độ của hợp chất 37 đối với sự biệt hóa thành u nguyên bào sợi, được đặc trưng bởi sự biểu hiện tăng của actin cơ trơn α và sự hình thành sợi stress.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực mà sáng chế có liên quan. Mặc dù các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô

tả ở đây đều có thể được sử dụng trong thực tiễn hoặc thử nghiệm theo sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên vẫn được mô tả. Đối với các mục đích của sáng chế, các thuật ngữ được định nghĩa dưới đây.

Dạng số ít "một" bao gồm dạng số nhiều tương đương. Ví dụ, "một nguyên tố" có nghĩa là một nguyên tố hoặc nhiều hơn một nguyên tố.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng" dùng để chỉ số lượng, mức, trị số, kích thước, hoặc lượng mà thay đổi nhiều bằng 30%, 25%, 20%, 15% hoặc 10% số lượng, mức, trị số, kích thước, cỡ, hoặc lượng tham chiếu.

Trong toàn bộ bản mô tả, trừ khi ngữ cảnh sử dụng thể hiện rõ ràng theo cách khác, các thuật ngữ "bao gồm", "gồm", và "chứa" được dự định là bao gồm bước hoặc dấu hiệu hoặc tập hợp các bước hoặc các dấu hiệu đã được chỉ ra nhưng không loại trừ bước hoặc dấu hiệu hoặc tập hợp các bước hoặc các dấu hiệu khác.

Thuật ngữ "alkyl" dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh tùy ý có 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Trong đó nếu thích hợp, nhóm alkyl có thể có số lượng nguyên tử cacbon xác định, ví dụ, -C₁-C₆ alkyl bao gồm các nhóm alkyl có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon theo cách sắp xếp mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ không giới hạn về các nhóm alkyl bao gồm methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, s- và t-butyl, pentyl, 2-methylbutyl, 3-methylbutyl, hexyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 4-methylpentyl, 2-ethylbutyl, 3-ethylbutyl, heptyl, octyl, nonyl, dextryl, undextryl, dodextryl, tridextryl, tetradextryl và pentadextryl.

Thuật ngữ "alkenyl" dùng để chỉ hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh không no, tùy ý được thế, có 2 đến 20 nguyên tử cacbon và có ít nhất một liên kết đôi. Nếu thích hợp, nhóm alkenyl có thể có số lượng nguyên tử cacbon xác định, ví dụ, C₂-C₆ alkenyl mà bao gồm các nhóm alkenyl có 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon theo cách sắp xếp mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ không giới hạn về

các nhóm alkenyl gồm, etenyl, propenyl, isopropenyl, butenyl, s- và t-butenyl, pentenyl, hexenyl, hept-1,3-dien, hex-1,3-dien, không phải là 1,3,5-trien và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "alkynyl" dùng để chỉ hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh không no tùy ý được thế, có 2 đến 20 nguyên tử cacbon, có ít nhất một liên kết ba. Nếu thích hợp, nhóm alkynyl có thể có số lượng nguyên tử cacbon xác định, ví dụ, C₂-C₆ alkynyl mà bao gồm các nhóm alkynyl có 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon theo các cách sắp xếp mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ không giới hạn gồm etynyl, propynyl, butynyl, pentynyl và hexynyl.

Thuật ngữ "xycloalkyl" và "vòng cacbon" dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon một vòng, hai vòng hoặc ba vòng no hoặc không no tùy ý được thế. Nếu thích hợp, nhóm xycloalkyl có thể có số lượng nguyên tử cacbon xác định, ví dụ, C₃-C₆ xycloalkyl là nhóm vòng cacbon có 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ không giới hạn có thể bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclopentenyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, xyclohexadienyl và các nhóm tương tự.

"Aryl" có nghĩa là hệ vòng cacbon một vòng, hai vòng hoặc ba vòng có C₆-C₁₄ cạnh có lên đến 7 nguyên tử trong mỗi vòng, trong đó ít nhất một vòng là thơm. Ví dụ về các nhóm aryl gồm, nhưng không giới hạn ở, phenyl, naphtyl, tetrahydronaphtyl, indanyl và biphenyl. Aryl có thể bao gồm 1-3 vòng benzen. Nếu có mặt hai hoặc nhiều vòng thơm, thì các vòng này có thể được ngưng tụ với nhau, sao cho các vòng liền kề có một liên kết chung.

Mỗi alkyl, alkenyl, alkynyl, xycloalkyl và aryl, cho dù là một phần tử riêng lẻ hoặc là một phần của một phần tử lớn hơn có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₆alkyl, C₂₋₆alkenyl, C₃₋₆xycloalkyl, oxo (=O), -OH, -SH, C₁₋₆alkylO-, C₂₋₆alkenylO-, C₃₋₆xycloalkylO-, C₁₋₆alkylS-, C₂₋₆alkenylS-, C₃₋₆xycloalkylS-, -CO₂H, -CO₂C₁₋₆alkyl, -NH₂, -NH(C₁₋

alkyl), -N(C₁₋₆alkyl)₂, -NH(phenyl), -N(phenyl)₂, -CN, -NO₂, -halogen, -CF₃, -OCF₃, -SCF₃, -CHF₂, -OCHF₂, -SCHF₂, -phenyl, -Ophenyl, -C(O)phenyl, -C(O)C₁₋₆alkyl. Ví dụ về các phân tử thể thích hợp gồm, nhưng không giới hạn ở, metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, vinyl, metoxy, etoxy, propoxy, isopropoxy, butoxy, metylthio, etylthio, propylthio, isopropylthio, butylthio, hydroxy, hydroxymetyl, hydroxyetyl, hydroxypropyl, hydroxybutyl, flo, clo, bromo, iot, xyano, nitro, -CO₂H, -CO₂CH₃, triflometyl, triflometoxy, triflometylthio, diflometyl, diflometoxy, diflometylthio, morpholino, amino, metylamino, dimetylamino, phenyl, phenoxy, phenylcacbonyl, benzyl và axetyl.

Hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng muối được dụng. Tuy nhiên nên được đánh giá cao rằng muối không được dụng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế do các muối này có thể hữu ích làm hợp chất trung gian trong quá trình điều chế muối được dụng hoặc có thể hữu ích trong khi bảo quản hoặc vận chuyển. Muối được dụng thích hợp gồm, nhưng không giới hạn ở, muối của axit vô cơ được dụng như axit hydrocloric, sulfuric, phosphoric, nitric, cacbonic, boric, sulfamic, và hydrobromic, hoặc muối của axit hữu cơ được dụng như axit axetic, propionic, butyric, tartaric, maleic, hydroxymaleic, fumaric, maleic, xitric, lactic, muxic, gluconic, benzoic, succinic, oxalic, phenylaxetic, metansulphonic, toluensulphonic, benezensulphonic, salixyclic sulphanilic, aspartic, glutamic, edetic, stearic, palmitic, oleic, lauric, pantothenic, tanic, ascorbic và valeric.

Muối bazơ gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối được tạo ra bằng các cation được dụng, như natri, kali, lithi, canxi, magie, amoni và alkylamoni.

Các nhóm chứa nitơ bazơ có thể được chia thành bốn phần bằng các chất này dưới dạng alkyl halogen bậc thấp, như metyl, etyl, propyl, và butyl clorua, bromua và iodu; dialkyl sulfat giống dimetyl và dietyl sulfat; và các nhóm khác.

Cũng sẽ nhận biết được rằng các hợp chất theo sáng chế có thể có tâm không đối xứng và do đó có khả năng tồn tại trong nhiều hơn một dạng chất đồng phân lập thể. Do đó sáng chế cũng đề cập đến các hợp chất về cơ bản có dạng đồng phân tinh khiết tại một hoặc nhiều tâm không đối xứng ví dụ, có độ tinh khiết về mặt quang học lớn hơn khoảng 90%, như có độ tinh khiết về mặt quang học khoảng 95% hoặc 97% hoặc có độ tinh khiết về mặt quang học lớn hơn 99%, cũng như các hỗn hợp, bao gồm các hỗn hợp raxemic, của chúng. Các chất đồng phân này có thể thu được bằng cách phân lập từ nguồn tự nhiên, bằng sự tổng hợp không đối xứng, ví dụ sử dụng các hợp chất trung gian không đối xứng, hoặc bằng sự phân giải không đối xứng. Các hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng chất đồng phân dị hình. Sáng chế cũng đề cập đến các hợp chất ở dạng *cis* (Z) hoặc *trans* (E) gần như tinh khiết hoặc hỗn hợp của chúng.

Hợp chất theo sáng chế có thể thu được bằng cách phân lập từ cây hoặc một bộ phận của cây, hoặc bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất đã phân lập, hoặc bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất có liên quan.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vết thương” dùng để chỉ sự phá vỡ vật lý có tính liên tục hoặc nguyên vẹn của cấu trúc mô. Các vết thương có thể là cấp tính hoặc mạn tính và bao gồm các vết cắt và vết rách, đường rạch mở hoặc vết thương, lỗ chích, chỗ da bị xước, bệnh phỏng da chân, vết thương nén, chỗ bị trầy da, vết thương chà sát, loét tư thế nằm (ví dụ loét do áp suất hoặc loét do nằm liệt giường); vết thương do tác động của nhiệt (các vết bỏng do nguồn lạnh và nóng), vết thương hóa học (ví dụ vết bỏng axit hoặc chất kiềm) hoặc nhiễm khuẩn gây bệnh (ví dụ virus, vi khuẩn hoặc nấm) bao gồm nhọt vỡ hoặc còn nguyên vẹn, sự phát ban da, tật và mụn trứng cá, chỗ loét, vết thương mạn tính, (bao gồm vết thương có liên quan đến bệnh đái tháo đường như chỗ loét phía dưới chân và bàn chân, chỗ loét gân chân và chỗ loét do áp suất), người cho cấy/ghép da và các vị trí tiếp nhận, điều kiện đáp ứng miễn dịch, ví dụ bệnh vẩy nến và chàm bội nhiễm, chỗ loét dạ dày hoặc ruột,

vết thương ở miệng, bao gồm chỗ loét ở miệng, sụn hoặc xương bị hư hại, vết thương do thủ thuật cắt cụt và thương tổn màng sừng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vết thương mạn tính” dùng để chỉ vết thương không được làm lành trong khoảng thời gian lành thông thường ở đối tượng khỏe mạnh khác. Vết thương mạn tính có thể là vết thương chưa lành do sức khỏe của đối tượng, ví dụ, khi đối tượng có sự tuân hoàn kém hoặc mắc bệnh như bệnh đái tháo đường, hoặc trong đó đối tượng đang uống thuốc mà ức chế quá trình làm lành bình thường. Quá trình làm lành cũng có thể bị suy giảm bởi bệnh nhiễm trùng, như nhiễm khuẩn, nhiễm nấm hoặc nhiễm ký sinh trùng. Trong một số trường hợp, vết thương mạn tính có thể vẫn chưa lành lại trong nhiều tuần, nhiều tháng hoặc thậm trí nhiều năm. Các ví dụ về vết thương mạn tính gồm nhưng không giới hạn ở, chỗ loét do bệnh đái tháo đường, chỗ loét do áp suất và chỗ loét khu trú.

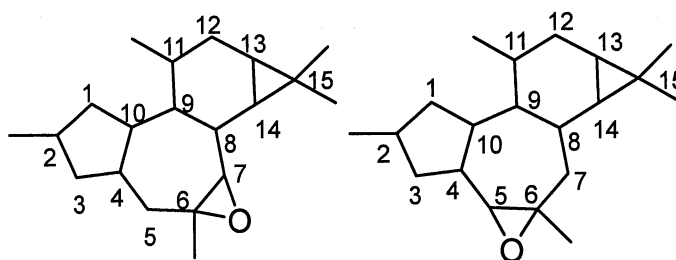
Thuật ngữ “thúc đẩy quá trình làm lành vết thương” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ sự cải thiện quá trình làm lành vết thương so với quá trình làm lành vết thương mà sẽ được quan sát ở vết thương không được điều trị. Phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương bao gồm bước làm tăng tốc độ làm lành vết thương, ví dụ, vết thương có thể lành lại với tốc độ nhanh hơn nhiều giờ, nhiều ngày hoặc nhiều tuần so với khi vết thương không được điều trị. Phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cũng có thể bao gồm bước làm giảm mô sẹo ở vết thương đang lành hoặc vết thương đã lành so với dự kiến khi vết thương không được điều trị.

Thuật ngữ "làm lành vết thương" dùng để chỉ sự phục hồi tính nguyên vẹn của mô, một phần hoặc là toàn bộ.

Thuật ngữ “làm giảm sự hình thành sẹo” hoặc “làm giảm mô sẹo” được đề cập ở đây dùng để chỉ hiệu quả thẩm mỹ được cải thiện và/hoặc mô bất thường giảm đi do sự làm lành vết thương so với khi vết thương không được điều trị. Theo một số

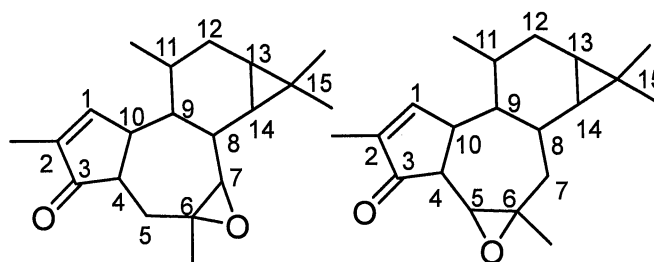
phương án, phương pháp làm giảm mô sẹo bao gồm bước làm giảm hoặc giảm thiểu mô bất thường, làm giảm hoặc giảm thiểu các thay đổi về sự hình thành sắc tố da và/hoặc cải thiện sự mọc lông so với khi vết thương không được điều trị.

Thuật ngữ "hợp chất epoxy-tiglian" dùng để chỉ hợp chất có một trong các cấu trúc vòng cacbon bazơ sau đây:



Các hợp chất có hệ trioxyclo[9.3.0.0]tetradecan với vòng xyclopropan ngưng tụ được gắn vào vòng có sáu cạnh. Epoxit được ngưng tụ với vòng có bảy cạnh trong vị trí 5,6 hoặc 6,7.

Thuật ngữ "hợp chất epoxy-tiglien-3-on" dùng để chỉ hợp chất có cấu trúc epoxy-tiglian được định nghĩa ở trên trong đó vòng năm cạnh có công thức cấu tạo 1,2-en-3-on:



Phương pháp làm lành vết thương

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương cho một đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng hợp chất epoxy-tiglian hoặc muối được dụng của nó.

Vết thương được làm lành có thể có trong cơ quan hoặc mô, bao gồm cơ quan hoặc mô bên trong hoặc mô bên ngoài, như da. Vết thương có thể là do tổn thương, vết cắn hoặc vết bỏng. Cơ quan hoặc mô có thể là một hoặc nhiều cơ quan trong số da, cơ, gan, thận, phổi, tim, tuyến tụy, lá lách, dạ dày, ruột, bàng quang, buồng trứng, tinh hoàn, dạ con, sụn, gân, dây chằng, xương và cơ quan tương tự. Theo các phương án cụ thể, vết thương là ở trong da và/hoặc cơ.

Theo một số phương án, hợp chất epoxy-tiglian được sử dụng sớm sau khi bị thương. Theo các phương án khác, vết thương là vết thương mạn tính mà không thể lành lại trong thời gian nhiều ngày, nhiều tuần, nhiều tháng hoặc nhiều năm. Theo các phương án khác, vết thương là vết thương hiện có mà không thể lành lại ở tốc độ bình thường hoặc không đáp ứng với các phương pháp điều trị bệnh khác.

Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể được bôi lên vết thương đang lành hoặc đã lành do sự hình thành sẹo quá mức. Các ví dụ về các vết thương này là các vết thương đang hình thành hoặc đã hình thành sẹo lồi hoặc sẹo phì đại.

Theo một số phương án, vết thương bị nhiễm trùng do vi khuẩn. Sự nhiễm khuẩn có thể do vi khuẩn Gram dương hoặc Gram âm gây ra, đặc biệt là vi khuẩn Gram dương. Ví dụ không giới hạn về vi khuẩn mà được kiểm soát bởi các hợp chất theo sáng chế bao gồm các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, như *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. firmis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. pantothenicus*, *B. alvei*, *B. brevis*, *B. circubins*, *B. laterosporus*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis* và *B. sphaericus*; *Staphylococcus* như *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*; *Streptococcus*, ví dụ, *S. pyrogenes*, *S. pneumoniae*, *S. alagactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. anginosus*, *S. salwarius*, *S. milleri*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. uberis* and *S. avium*; *Aerococcus* spp., *Gemella* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Kurthia* spp., *Lactobacillus* spp., *Erysipelothrix* spp., *Arachnia* spp., *Actinomyces* spp.,

Propionibacterium spp., *Rothia spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Serratia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Nocardia spp.* và *Mycobacterium spp.*

Theo một số phương án, vết thương bị nhiễm trùng do nấm. Bệnh nhiễm nấm có thể gây ra bởi nấm sợi hoặc nấm men. Ví dụ không giới hạn về nấm mà được khống chế bởi các hợp chất theo sáng chế bao gồm nấm thuộc chi như *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*, *Trichophyton spp.*, *Cladosporium spp.*, *Ulocladium spp.*, *Curvularia spp.*, *Aureobasidium spp.*, *Candida albicans*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Malessezia pachydermatis*, *Malessezia spp.* và *Trichosporon spp.*

Theo một số phương án, vết thương bị nhiễm trùng do cả vi khuẩn và nấm, bao gồm trong các màng sinh học.

Đối tượng có vết thương được làm lành có thể là đối tượng bất kỳ bao gồm động vật có vú, chim, cá và loài bò sát. Theo một số phương án, đối tượng là người, vật nuôi trong gia đình, động vật phòng thí nghiệm, vật nuôi trong trang trại hoặc vật nuôi làm việc, chim được nuôi trong trang trại, động vật đua hoặc động vật hoang được bắt giữ như các con vật được nhốt trong sở thú. Các ví dụ về đối tượng thích hợp gồm nhưng không giới hạn ở người, chó, mèo, thỏ, chuột đồng, chuột lang, chuột thường, chuột nhắt, ngựa, gia súc, cừu, dê, hươu, lợn, khỉ, thú có túi, gà, ngỗng, chim hoàng yến, chim yến phụng, cá sấu, rắn, thằn lằn và loài tương tự. Theo các phương án cụ thể, đối tượng là đối tượng động vật có vú như người, chó, mèo, ngựa, gia súc, cừu, dê, lợn, hươu, chuột nhắt, chuột lang, chuột túi, thỏ hoặc chuột.

Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất epoxy-tiglian thúc đẩy quá trình làm lành vết thương bằng cách làm tăng tốc độ làm lành vết thương. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất epoxy-tiglian thúc đẩy sự làm lành bằng cách làm giảm sự hình thành sẹo hoặc lượng mô sẹo để tạo thành vết thương khi không được

điều trị. Theo một số phương án, phương pháp điều trị cải thiện kết quả hoặc hiệu quả thẩm mỹ hoặc hình thái của vết thương sau khi nó đã lành bao gồm bước cải thiện sắc tố da và cải thiện sự mọc lông lại so với vết thương chưa được điều trị.

Theo các phương án cụ thể để thúc đẩy quá trình làm lành vết thương, phương pháp điều trị bệnh tốt hơn là khu trú tại hoặc quanh vị trí hoặc được sử dụng trong tổn thương để tạo ra tác dụng khu trú.

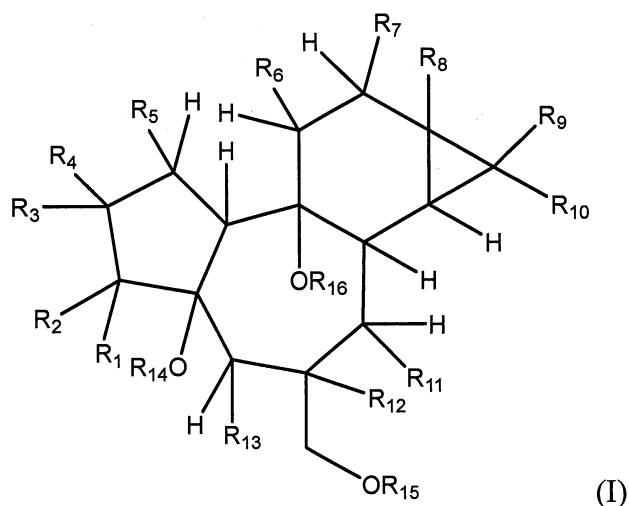
"Lượng hữu hiệu" có nghĩa là lượng cần đến ít nhất một phần để thu được đáp ứng mong muốn, ví dụ, để khởi đầu quá trình làm lành vết thương hoặc để làm tăng tốc độ làm lành vết thương. Lượng này thay đổi phụ thuộc vào điều kiện sức khỏe và sinh lý của cá thể được điều trị, nhóm taxonomic của cá thể được điều trị, sự bào chế chế phẩm, sự đánh giá tình trạng y khoa, và các yếu tố có liên quan khác. Mong đợi rằng lượng này sẽ nằm trong khoảng tương đối rộng mà có thể được xác định thông qua các thử nghiệm thông thường. Lượng hữu hiệu liên quan đến bệnh nhân là người, ví dụ, có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 ng trên mỗi kg cân nặng đến 1 g trên mỗi kg cân nặng đối với mỗi liều lượng. Liều lượng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 1 g trên mỗi kg cân nặng đối với mỗi liều lượng, như nằm trong khoảng từ 0,5 mg đến 1 g trên mỗi kg cân nặng đối với mỗi liều lượng. Theo một phương án, liều lượng này nằm trong khoảng từ 1 mg đến 500 mg đối với mỗi liều lượng. Theo một phương án khác, liều lượng nằm trong khoảng từ 1 mg đến 250 mg đối với mỗi liều lượng. Theo một phương án khác nữa, liều lượng nằm trong khoảng từ 1 mg đến 100 mg đối với mỗi liều lượng, như lên đến 50 mg đối với mỗi liều lượng. Theo một phương án khác nữa, liều lượng nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 1 mg trên mỗi kg cân nặng đối với mỗi liều lượng. Chế độ liều lượng có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng điều trị bệnh tối ưu. Ví dụ, các liều được chia khác nhau có thể được sử dụng hằng ngày, hàng tuần, hàng tháng hoặc các khoảng thời gian thích hợp khác, hoặc liều lượng có thể giảm đi tương ứng theo tính cấp thiết của từng trường hợp.

Theo một số phương án, hợp chất epoxy-tiglian hoặc chất chiết thực vật chứa ít nhất một hợp chất epoxy-tiglian có thể được sử dụng riêng rẽ, đồng thời hoặc tuần tự, hoặc trong cùng một chế phẩm làm hoạt chất được khác mà hữu ích để làm lành vết thương. Ví dụ, hợp chất epoxy-tiglian có thể được sử dụng kết hợp với thuốc kháng sinh và/hoặc chất chống viêm. Thuốc kháng sinh thích hợp bao gồm thuốc kháng sinh beta-lactam như penixilin, ampixilin, amoxyxilin, flucloxacilin, dicloxacilin, methaxilin, carbenixilin và noroxilin; cephalosporin như xephalexin, xefacetril, xefadroxil, xefaloglyxin, xefalonium, xefalordidin, xefatrizin, xeaclor, xefproxil, xefuzonam, xefmetozol, loracarbef, xefminox, xefdindir, xefpodoxim, và xefpirom; carbapenem như imipenem, meropenem, ertapenem, daripenem, panipenem và biapenem; aminoglycosit như gentamixin, streptomycin, neomycin, kanamycin, vancomycin, erythromycin và asithromycin; oxazolidinon như linezolit và posizolit, lincosamit như clindamycin, quinolin như axit oxolinic, xiprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, lomefloxacin, levofloxacin và difloxacin; và sulfonamit như sulfamethoxazol, sulfoadiazin và sulfaxetamit, hoặc hỗn hợp như amoxyclav (amoxyxilin và axit clavulinic). Chất chống viêm thích hợp bao gồm thuốc chống viêm không steroid như meloxicam, piroxicam, oxicam, aspirin, difunisal, ibuprofen, dexibuprofen, naproxen, ketoprofen, indomethacin, tolmetin, axit mefenamic, numisulit và các chất tương tự và corticosteroid như hydrocortison, prednisolon, methylprednisolon, prednison, budesonit, betametason và dexametason.

Hợp chất epoxy-tiglian có thể được sử dụng kết hợp với các trị liệu làm lành vết thương khác như gạc và thuốc mỡ, thuốc xức và gel. Ví dụ, hợp chất epoxy-tiglian có thể được sử dụng kết hợp với gạc phủ bạc và gạc, thuốc mỡ, thuốc xức và gel chứa các chất dùng để điều trị bệnh như iốt, lô hội, cây paw paw, hoặc mật ong có hoạt tính được như mật ong gỗ manuka hoặc các hoạt chất sinh học hoặc sinh lý học khác như chất chống virus, chất chống khuẩn, chất kháng nấm, và vitamin, như A, C, D và E và các este của chúng. Hợp chất epoxy-tiglian cũng có thể được sử dụng kết hợp với gạc để tạo ra cấu trúc phân tử cho vết thương. Gạc này có thể bao

gồm màng polyme và màng polyme liên kết ngang, như axit hyaluronic và cấu trúc có liên quan, bao gồm axit hyaluronic liên kết ngang.

Theo một số phương án, hợp chất epoxy-tiglian là hợp chất có công thức (I):



trong đó

R₁ là hydro và R₂ là -OR₁₇; hoặc R₁ và R₂ cùng tạo thành nhóm cacbonyl (=O);

R₃ là hydro hoặc C₁₋₆alkyl;

R₄ và R₅ độc lập là hydro hoặc -OR₁₇; hoặc R₄ và R₅ cùng tạo thành liên kết đôi hoặc epoxit (-O-);

R₆ là hydro hoặc C₁₋₆alkyl;

R₇ là -OH hoặc -OR₁₈;

R₈ là -OH hoặc -OR₁₈; với điều kiện là cả R₇ và R₈ đều không phải là -OH;

R₉ và R₁₀ độc lập được chọn từ hydro và C₁₋₆alkyl;

R₁₁ và R₁₂ hoặc R₁₂ và R₁₃ cùng tạo thành epoxit và nhóm còn lại của R₁₁ và R₁₃ là hydro, -OH hoặc -OR₁₇;

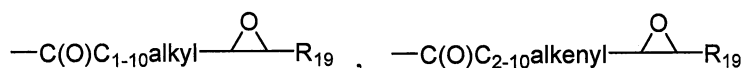
R₁₄ là hydro hoặc -R₁₇;

R₁₅ là hydro hoặc -R₁₇;

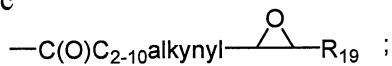
R₁₆ là hydro hoặc -R₁₇;

R₁₇ là hydro, -C₁₋₆alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C(O)C₁₋₆alkyl, -C(O)C₂₋₆alkenyl hoặc -C(O)C₂₋₆alkynyl;

R_{18} là C_{1-20} alkyl, $-C_{2-20}$ alkenyl, $-C_{2-20}$ alkynyl, $-C(O)C_{1-20}$ alkyl, $-C(O)C_{2-20}$ alkenyl, $-C(O)C_{2-20}$ alkynyl, $-C(O)$ xycloalkyl, $-C(O)C_{1-10}$ alkylxycloalkyl; $-C(O)C_{2-10}$ alkenylxycloalkyl, $-C(O)C_{2-10}$ alkynylxycloalkyl, $-C(O)$ aryl, $-C(O)C_{1-10}$ alkylaryl, $-C(O)C_{2-10}$ alkenylaryl, $-C(O)C_{2-10}$ alkynylaryl, $-C(O)C_{1-10}$ alkylC(O) R_{19} , $-C(O)C_{2-10}$ alkenylC(O) R_{19} , $-C(O)C_{2-10}$ alkynylC(O) R_{19} , $-C(O)C_{1-10}$ alkylCH(OR $_{19}$)(OR $_{19}$), $-C(O)C_{2-10}$ alkenylCH(OR $_{19}$)(OR $_{19}$), $-C(O)C_{2-10}$ alkynylCH(OR $_{19}$)(OR $_{19}$), $-C(O)C_{1-10}$ alkylSR $_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$ alkenylSR $_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$ alkynylSR $_{19}$, $-C(O)C_{1-10}$ alkylC(O)OR $_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$ alkenylC(O)OR $_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$ alkynylC(O)OR $_{19}$, $-C(O)C_{1-10}$ alkylC(O)SR $_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$ alkenylC(O)SR $_{19}$, $-C(O)C_{2-10}$ alkynylC(O)SR $_{19}$,



hoặc

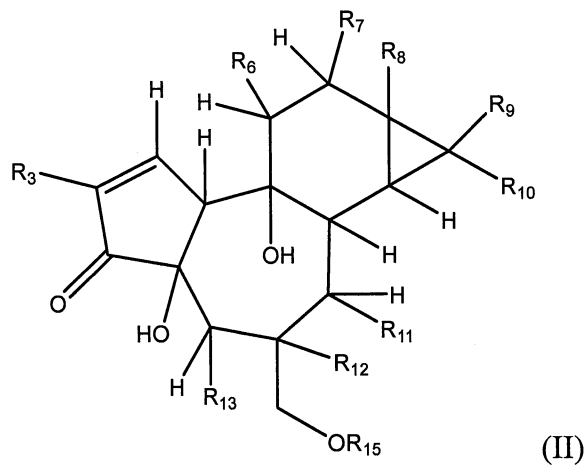


và

R_{19} là hydro, $-C_{1-10}$ alkyl, $-C_{2-10}$ alkenyl, $-C_{2-10}$ alkynyl, xycloalkyl hoặc aryl;

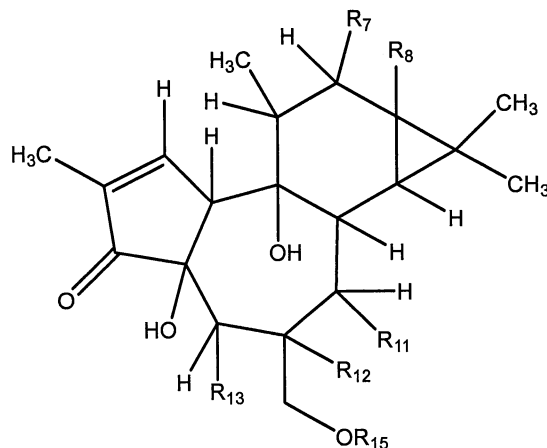
trong đó mỗi nhóm alkyl, alkenyl, alkynyl, xycloalkyl hoặc aryl tùy ý được thế; hoặc chất đồng phân dị hình hoặc chất đồng phân lập thể hoặc muối được dùng của nó.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (I) là hợp chất epoxy-tigliaen-3-on có công thức (II):



trong đó R₃, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ và R₁₅ là như được xác định bởi công thức (I).

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (I) hoặc (II) là hợp chất có công thức (III):



trong đó R₇, R₈, R₁₁, R₁₂, R₁₃ và R₁₅ là như được xác định bởi công thức (I).

Theo các phương án cụ thể, công thức (I), công thức (II) hoặc công thức (III) có thể có một hoặc nhiều cách áp dụng sau đây:

R₁ là hydro và R₂ là OH hoặc -OC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenyl hoặc -OC(O)C₂₋₆alkynyl, hoặc R₁ và R₂ cùng tạo thành nhóm cacbonyl; đặc biệt là trong đó R₁ và R₂ cùng tạo thành nhóm cacbonyl;

R₃ là hydro hoặc -C₁₋₃alkyl, đặc biệt là -C₁₋₃alkyl, đặc biệt hơn là metyl;

R₄ là hydro hoặc -OH, -OC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenyl hoặc -OC(O)C₂₋₆alkynyl và

R₅ là hydro hoặc -OH, -OC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenyl hoặc -OC(O)C₂₋₆alkynyl; hoặc R₄ và R₅ cùng tạo thành liên kết đôi hoặc epoxit; đặc biệt là trong đó R₄ và R₅ cùng tạo thành liên kết đôi;

R₆ là hydro hoặc -C₁₋₃alkyl, đặc biệt là -C₁₋₃alkyl, đặc biệt hơn là metyl;

R₇ là -OH, -OC(O)C₁₋₁₅alkyl, -OC(O)C₂₋₁₅alkenyl, -OC(O)C₂₋₁₅alkynyl, -OC(O)aryl trong đó nhóm aryl tùy ý được thế, -OC(O)C₁₋₁₅alkylaryl, -OC(O)C₁₋₁₀alkylC(O)H, -OC(O)C₂₋₁₀alkenylC(O)H, -OC(O)C₁₋₁₀alkylC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₁₀alkenylC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₁₋₁₀alkylCH(OC₁₋₃alkyl)(OC₁₋₃alkyl), -OC(O)C₂₋₁₀alkenylCH(OC₁₋₃alkyl)(OC₁₋₃alkyl), -OC(O)C₁₋₁₀alkylSC₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₁₀alkenylSC₁₋₆alkyl, -OC(O)C₁₋₁₀alkylC(O)OC₁₋₆alkyl hoặc -OC(O)C₂₋₁₀alkylC(O)OC₁₋₆alkyl; đặc biệt là -OH, -OC(O)C₁₋₁₅alkyl, -OC(O)C₂₋₁₂alkenyl, -OC(O)C₂₋₁₂alkynyl, -OC(O)aryl trong đó nhóm aryl tùy ý được thế, -OC(O)C₁₋₁₂alkylaryl, -OC(O)C₁₋₆alkylC(O)H, -OC(O)C₂₋₆alkenylC(O)H, -OC(O)C₁₋₆alkylC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenylC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₁₋₆alkylCH(OC₁₋₃alkyl)(OC₁₋₃alkyl), -OC(O)C₂₋₆alkenylCH(OC₁₋₃alkyl)(OC₁₋₃alkyl), -OC(O)C₁₋₆alkylSC₁₋₃alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenylSC₁₋₃alkyl, -OC(O)C₁₋₆alkylC(O)OC₁₋₃alkyl hoặc -OC(O)C₂₋₆alkylC(O)OC₁₋₃alkyl;

R₈ là -OC(O)C₁₋₁₅alkyl, -OC(O)C₂₋₁₅alkenyl, -OC(O)C₂₋₁₅alkynyl, hoặc -OC(O)aryl trong đó nhóm aryl tùy ý được thế, đặc biệt là -OC(O)C₁₋₁₀alkyl, -OC(O)C₂₋₁₀alkenyl, -OC(O)C₂₋₁₀alkynyl hoặc -OC(O)aryl trong đó nhóm aryl tùy ý được thế; đặc biệt hơn là -OC(O)C₁₋₁₀alkyl, -C(O)C₂₋₁₀alkenyl và -OC(O)aryl trong đó nhóm aryl tùy ý được thế;

R₉ và R₁₀ độc lập là -C₁₋₃alkyl, đặc biệt là trong đó cả R₉ và R₁₀ đều là metyl;

R₁₁ và R₁₂ cùng tạo thành epoxit và R₁₃ là -OH, -OC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenyl hoặc -OC(O)C₂₋₆alkynyl, đặc biệt là -OH hoặc -C(O)C₁₋₃alkyl; hoặc

R₁₂ và R₁₃ cùng tạo thành epoxit và R₁₁ là -OH, -OC(O)C₁₋₆alkyl, -OC(O)C₂₋₆alkenyl hoặc -OC(O)C₂₋₆alkynyl, đặc biệt là -OH; và

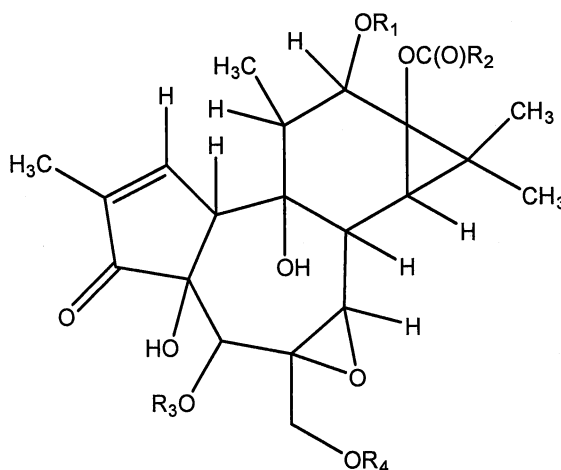
R_{14} là hydro, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{2-6}alkenyl$ hoặc $-C(O)C_{2-6}alkynyl$, đặc biệt là hydro;

R_{15} là hydro, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{2-6}alkenyl$ hoặc $-C(O)C_{2-6}alkynyl$, đặc biệt là hydro hoặc $-C(O)C_{1-3}alkyl$; và

R_{16} là hydro, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{2-6}alkenyl$ hoặc $-C(O)C_{2-6}alkynyl$, đặc biệt là hydro.

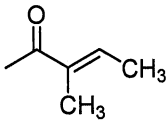
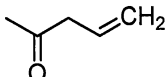
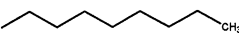
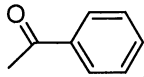
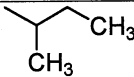
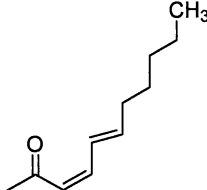
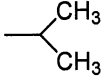
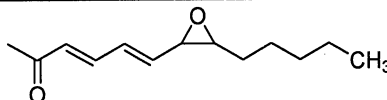
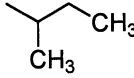
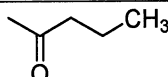
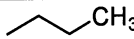
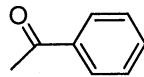
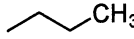
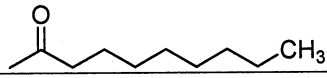
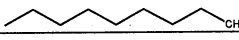
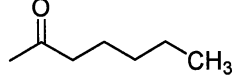
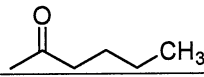
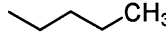
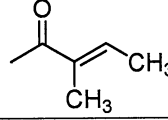
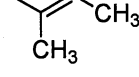
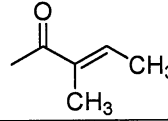
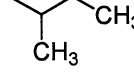
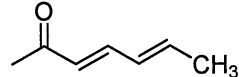
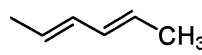
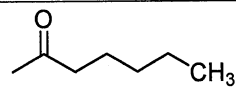
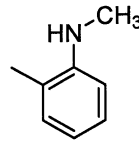
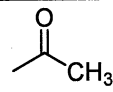
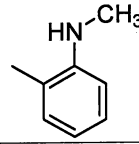
Theo các phương án cụ thể, hợp chất epoxy-tiglian được chọn từ một trong các hợp chất sau đây trong các bảng từ 1 đến 6:

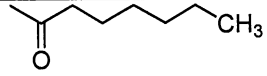
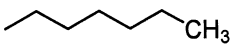
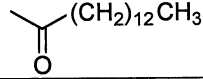
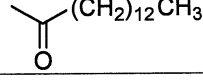
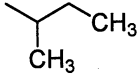
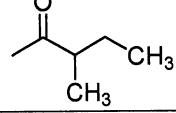
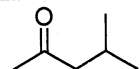
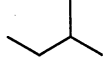
Bảng 1



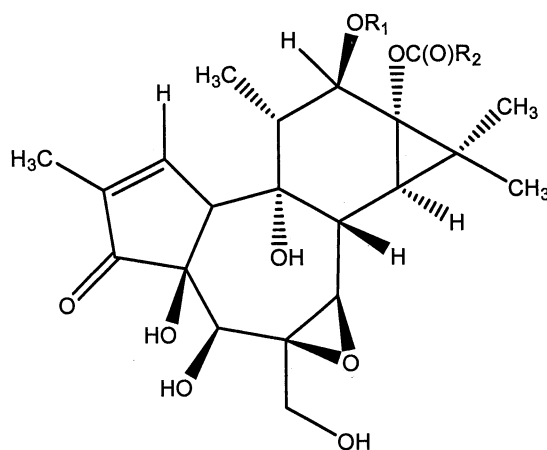
Hợp chất	R_1	R_2	R_3	R_4
1			H	H
2			H	H
3			H	H
4			H	H
5			H	H

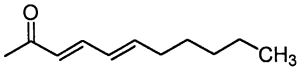
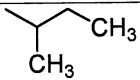
6			H	H
7			H	H
8			H	H
9			H	H
10			H	H
11			H	H
12			H	H
13			H	H
14			H	H
15			H	H
16			H	H
17			H	H
18			H	H
19			H	H
20			H	H

21			H	H
22			H	H
23			H	H
25			H	H
26			H	H
27			H	H
28			H	H
41			H	H
42			H	H
43			H	H
44			H	H
45				
46			H	H
47			H	H
48			H	H

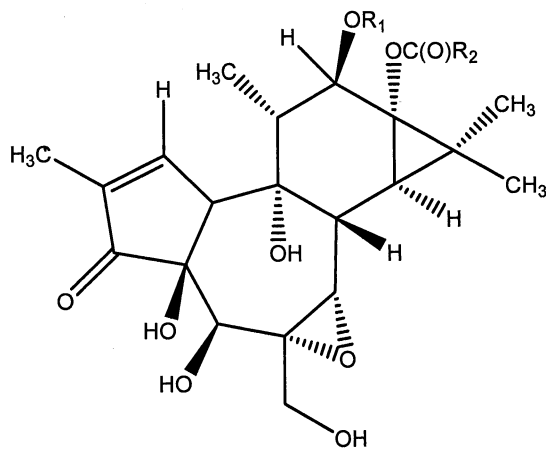
49			H	H
50		-CH ₃	H	H
51			H	H
52		-CH ₃	H	H
53	-OH		H	H
60			H	H

Bảng 2:



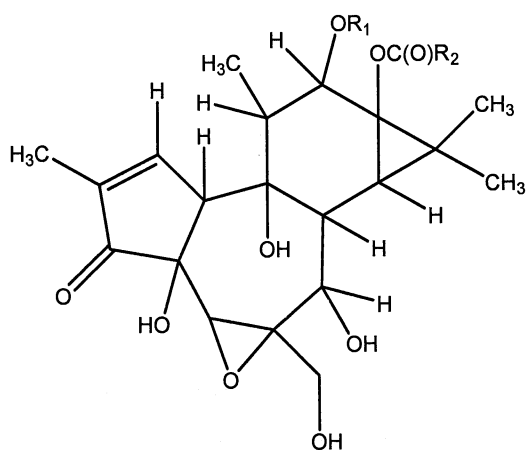
Hợp chất	R ₁	R ₂
24		

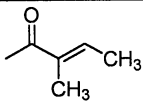
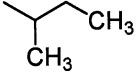
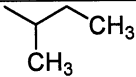
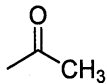
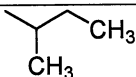
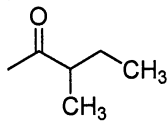
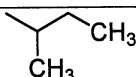
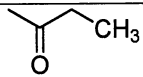
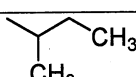
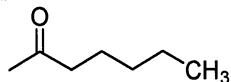
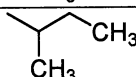
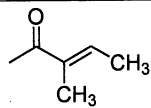
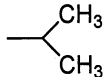
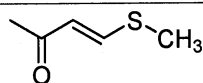
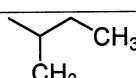
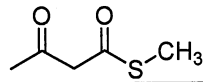
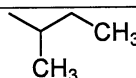
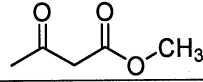
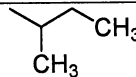
Bảng 3:



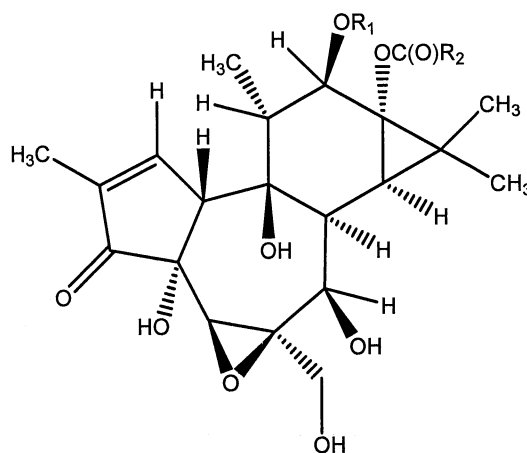
Hợp chất	R ₁	R ₂
54		
55		
56		
57		

Bảng 4:



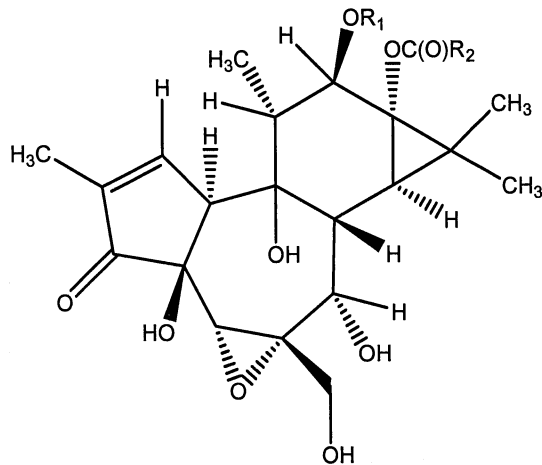
Hợp chất	R ₁	R ₂
29		
30	-H	
31		
32		
33		
34		
35		
36		
39		
40		

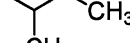
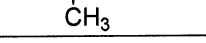
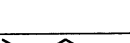
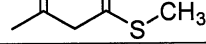
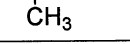
Bảng 5:



Hợp chất	R ₁	R ₂
37		

Bảng 6:



Hợp chất	R ₁	R ₂
38		
58		
59		

Hợp chất theo sáng chế có thể có dạng hợp chất tinh khiết hoặc có dạng chất chiết thực vật.

Trong trường hợp các hợp chất được mô tả có cấu trúc hóa học lập thể, hóa học lập thể được mô tả là hóa học lập thể tương đối và dựa trên sự hiểu biết về các con đường sinh tổng hợp và phân tích hóa học.

Theo một số phương án, chất chiết thực vật là từ thực vật thuộc chi *Fontainea* hoặc *Hylandia*, đặc biệt là các loài là *Fontainea pancheri*, *Fontainea australis*, *Fontainea borealis*, *Fontainea fugax*, *Fontainea oraria*, *Fontainea picrosperma*,

Fontainea rostrata, *Fontainea subpapuana*, *Fontainea venosa* hoặc *Hylandia dockrillii*, đặc biệt là *Fontainea picrosperma*, *Fontainea australis*, *Fontainea rostrata* hoặc *Hylandia dockrillii*.

Các bộ phận của cây có thể bao gồm thịt quả, hạt, vỏ, thân, lá, hoa, rễ, nội nhũ, vỏ quả ngoài và thân gỗ, đặc biệt là trong đó chất chiết thu được từ hạt giống.

Chất chiết của thực vật có thể thu được bằng các phương pháp tiêu chuẩn, ví dụ, sinh khối thu được từ hạt giống, lá, thịt quả, nội nhũ, vỏ quả ngoài, thân hoặc vỏ của cây phụ thuộc vào sự chiết dung môi ban đầu, như với dung môi phân cực, ví dụ, etanol. Chất chiết ban đầu tiếp đó được cô đặc và được pha loãng với nước và được chiết với dung môi thứ hai, ví dụ, etyl axetat. Mẫu dung môi từ lần chiết thứ hai được thu gom và được tách bằng cất phân đoạn HPLC điều chế. Các phần cất được phân tích bằng HPLC phân tích và được thu gom theo thời gian lưu giữ các hợp chất được tìm thấy trong mẫu. Các phần cất đã được gom được cân, được thử nghiệm sinh học và được phân tích bằng HPLC phân tích. Phương pháp cất phân đoạn khác sử dụng một hoặc nhiều HPLC điều chế được thực hiện để phân lập các hợp chất cụ thể. Mỗi hợp chất được thử nghiệm sinh học và cấu trúc của nó được nhận biết bằng các kỹ thuật UV, NMR và phổ khối.

Các hợp chất khác theo sáng chế có thể thu được bằng cách tạo dẫn xuất các hợp chất được phân lập từ cây hoặc các bộ phận của cây, đặc biệt là từ chi *Fontainea*, đặc biệt là từ loài *Fontainea picrosperma*, đặc biệt là các hạt giống của *Fontainea picrosperma*.

Các dẫn xuất của các hợp chất tự nhiên có thể thu được bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, nhóm hydroxy có thể được oxy hóa thành keton, aldehyt hoặc axit carboxylic bằng sự phơi nhiễm với các chất oxy hóa như axit cromic, chất phản ứng Jones, KMnO_4 , peraxit như mCPBA (axit metacloperbenzoic) hoặc dioxiran như dimetyldioxiran (DMDO) và metyl(triflometyl)dioxiran (TFDO).

Các chất oxy hóa có thể được chọn để các nhóm chức khác trong phân tử được hoặc không được oxy hóa. Ví dụ, rượu bậc nhất có thể được oxy hóa chọn lọc thành aldehyt hoặc axit carboxylic với sự có mặt của rượu bậc hai sử dụng các chất phản ứng như $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ -benzen. Rượu bậc hai có thể được oxy hóa chọn lọc thành keton với sự có mặt của rượu bậc nhất sử dụng Cl_2 -pyridin hoặc NaBrO_3 -xeric-amoni nitrat. Rượu có thể được oxy hóa với sự có mặt của liên kết đôi và liên kết ba và mà không cần epime hóa tại các tâm lập thể liền kề bằng cách sử dụng các chất phản ứng Jones có hoặc không có Xelit (hoặc amoni clorua). Nói cách khác, các chất phản ứng được chọn có thể ít chọn lọc hơn dẫn đến sự oxy hóa nhiều hơn một nhóm chức.

Nhóm hydroxy cũng có thể được tạo dẫn xuất bằng cách ete hóa hoặc axyl hóa. Ví dụ, ete có thể được điều chế bằng cách tạo thành ion alkoxit với sự có mặt của bazơ và phản ứng của alkoxit với alkylhalogen, alkenylhalogen, alkynylhalogen hoặc arylhalogen thích hợp. Tương tự phản ứng axyl hóa có thể đạt được bằng cách tạo thành ion alkoxit và phản ứng với axit carboxylic thích hợp hoặc axit carboxylic hoạt hóa (như anhydrit hoặc axylclorua).

Nhóm axyl có thể được thủy phân để tạo ra rượu bằng cách thủy phân axit hoặc bazơ như được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và các rượu đó có thể còn được tạo dẫn xuất như trên.

Keton có thể được khử thành rượu bậc hai bằng các chất khử như lithi nhôm hydrua và các hydrua kim loại khác mà không cần khử các liên kết đôi, bao gồm keton chưa bão hòa α .

Liên kết đôi và liên kết ba có thể được khử thành liên kết đơn sử dụng phản ứng khử có xúc tác, ví dụ, H_2/Pd . Liên kết đôi có thể được oxy hóa thành epoxit bằng cách sử dụng chất oxy hóa như peraxit, ví dụ mCPBA hoặc dioxiran, như

DMDO và TFDO. Liên kết đôi cũng có thể được phản ứng cộng để tạo ra các phân tử thế như nhóm halo, nhóm hydroxy hoặc alkoxy.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan sẽ có thể xác định các điều kiện thích hợp để thu được các dẫn xuất của các hợp chất được phân lập, ví dụ, bằng cách viện dẫn các nội dung có liên quan đến hệ phương pháp tổng hợp, các ví dụ về các phương pháp này được mô tả trong Smith M.B. and March J., *March's Advanced Organic Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley & Sons Inc., 2001 và Larock R.C., *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers Ltd., 1989. Hơn nữa, các thao tác chọn lọc các nhóm chức có thể cần đến sự bảo vệ các nhóm chức khác. Các nhóm bảo vệ thích hợp để ngăn chặn các phản ứng phụ không mong muốn được mô tả Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons Inc., 3rd Edition, 1999.

Hợp chất theo sáng chế

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các hợp chất bao gồm:

12-hexanoyl-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 5);

12-axetyl-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 6);

12-propanoyl-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 7);

12-butanoyl-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 8);

12-[(2*E*,4*E*)-(6,6-dimetoxyhexa-2,4-dienoyl)]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 9);

12-[(2*E*,4*E*)-6-oxohexa-2,4-dienoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 10);

12-[(2*E*,4*E*)-6,7-dihydroxydodeca-2,4-dienoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 11);

12-[(2*E*)-4,5-dihydroxy-deca-2-enoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 12);
 12-tigloyl-13-(2-methylpropanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 13);
 12-[(2*E*)-3-methylthioprop-2-enoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 14);
 12-(2-methylprop-2-enoyl)-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 15);
 12-[(2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 16);
 12-[(2*E*,4*E*)-8-oxododeca-2,4-dienoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 17);
 12-[(2*Z*,4*E*)-deca-2,4-dienoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 18);
 13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 19);
 12-[(2*E*)-but-2-enoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 20);
 12-tigloyl-13-butanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 21);
 12-(3-butenoyl)-13-nonanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 22);
 12-benzoyl-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 23);
 12-[(2*Z*,4*E*)-deca-2,4-dienoyl]-13-(2-methylpropanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 25);
 12-[(2*E*,4*E*)-6,7-(anti)-epoxy-dodeca-2,4-dienoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 26);
 12,13-dibutanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 27);

- 12-benzoyl-13-butanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on
(hợp chất 28);
- 12-tigloyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 29);
- 13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 30);
- 12-axetyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 31);
- 12,13-di-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 32);
- 12-propanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 33);
- 12-hexanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 34);
- 12-tigloyl-13-(2-metylpropanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 35);
- 12-[(2*E*)-3-methylthioprop-2-enoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 36);
- 12-{[2-(metylsulfanyl)carbonyl]-axetoyl}-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 39);
- 12-[(2-metoxycarbonyl)-axetoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 40);
- 12,13-di-nonoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 41);
- 12,13-di-hexanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 42);
- 12,13-di-pentanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 43);
- 12,13-di-tigloyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 44)

5,20-diaxetyl-12-tigloyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 45);
 12,13-di-(2*E*,4*E*)-hex-2,4-enoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 46);
 12-hexanoyl-13-[2-(N-metylantraniloyl)]-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 47)
 12-axetyl-13-[2-(N-metylantraniloyl)]-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 48);
 12,13-di-heptanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 49);
 12-myristoyl-13-axetyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 50);
 12-myristoyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 51);
 12-(2-metylbutanoyl)-13-axetyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 52); và
 13-hexanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 53);
 12,13-di-(3-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3on (hợp chất 60)
 hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án khác của sáng chế, hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất từ 5 đến 53 hoặc 60 hoặc muối được dụng của nó có thể có dạng được phẩm cùng với chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá được dụng.

Chế phẩm

Trong khi hợp chất epoxy-tiglian hoặc muối được dụng của nó, có thể được sử dụng ở dạng nguyên chất, có thể thuận tiện hơn để sử dụng các hợp chất epoxy-tiglian dưới dạng được phẩm cùng với chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá được dụng.

Dạng liều lượng và tốc độ sử dụng dược phẩm và chế phẩm dễ dàng có thể xác định được bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan.

Dạng liều lượng bao gồm viên nén, chất phân tán, hỗn dịch, thuốc tiêm, dung dịch, si-rô, viên thuốc, viên nang, thuốc đạn, bình xịt, miếng đắp da, miếng băng hút thấm (hút giữ), kem, gel và các dạng tương tự. Các dạng liều lượng này cũng có thể cũng bao gồm dụng cụ tiêm hoặc cấy dưới da cụ thể được chỉ định, hoặc biến đổi, được giải phóng có kiểm soát của dược phẩm. Sự giải phóng có kiểm soát của chất trị liệu có thể được thực hiện bằng cách phủ lên chúng, ví dụ, polyme kỵ nước bao gồm nhựa acrylic, sáp, rượu béo bậc cao, axit polyactic và polyglycolic và các dẫn xuất xenluloza đã biết như hydroxypropylmetyl xenluloza. Ngoài ra, sự giải phóng có kiểm soát có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nền polyme, liposom và/hoặc trung thể khác.

Chất mang dược dụng và chất mang có thể chấp nhận được để sử dụng toàn thân cũng có thể được kết hợp vào chế phẩm theo sáng chế

Một cách thích hợp, dược phẩm bao gồm tá dược dược dụng hoặc tá dược có thể chấp nhận được. “Tá dược dược dụng” có nghĩa là chất độn rắn hoặc lỏng, chất pha loãng hoặc chất bao nang có thể được sử dụng một cách an toàn. Tùy thuộc vào đường dùng cụ thể, các chất mang khác nhau, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng. Các chất mang hoặc tá dược này có thể được chọn từ nhóm bao gồm đường, tinh bột, xenluloza và dẫn xuất của nó, mạch nha, gelatin hoặc chất keo hóa khác, đá tan, canxi sulphat, dầu thực vật, dầu tổng hợp, rượu và/hoặc rượu polyhydric, axit alginic, dung dịch đệm phosphat, chất nhũ hóa, nước muối đẳng trương, và nước không chứa pyrogen.

Đường dùng thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để cung cấp cho bệnh nhân là người hoặc không phải là người bằng dược phẩm theo sáng chế. Ví dụ, có thể sử

dùng đường dùng qua đường miệng, khu trú, trực tràng, ngoài đường tiêu hóa, dưới lưỡi, trong má, trong tĩnh mạch, trong khớp, trong cơ, trong da, dưới da, đường hít, trong mắt, trong màng bụng, trong thất não, qua chân bì và các đường dùng tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế có thể thích hợp để sử dụng có trong các đơn vị rời rạc như ống tiêm, lọ nhỏ, ống, viên nang, gói hoặc viên nén, mỗi đơn vị chứa một lượng định trước của một hoặc nhiều hợp chất hoặc chất chiết có hoạt tính được theo sáng chế, dưới dạng bột hoặc hạt nhỏ hoặc dưới dạng dung dịch hoặc hỗn dịch trong chất lỏng chứa nước, dung dịch xyclodextrin, chất lỏng không chứa nước, nhũ tương dầu trong nước hoặc nhũ tương nước trong dầu hoặc dưới dạng dung dịch hoặc hỗn dịch trong kem hoặc gel hoặc dưới dạng hỗn dịch chứa các vi hạt hoặc hạt nano kết hợp với hợp chất theo sáng chế, gồm nhưng không giới hạn ở silic dioxit hoặc vi hạt hoặc hạt nano polylactit. Các chế phẩm này có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp y học nhưng tất cả các phương pháp này đều bao gồm bước đưa vào kết hợp một hoặc nhiều hợp chất có hoạt tính được theo sáng chế với chất mang mà cấu thành một hoặc nhiều thành phần thiết yếu. Nói chung, các chế phẩm này có thể được điều chế bằng cách trộn đều và kỹ các chất theo sáng chế với chất mang lỏng hoặc chất mang rắn rất nhỏ mịn hoặc cả hai, và tiếp đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm thành sản phẩm mong muốn.

Trong bột, chất mang là chất rắn rất nhỏ mịn trong hỗn hợp với thành phần hoạt tính rất nhỏ mịn.

Trong các viên nén, thành phần hoạt tính được trộn với chất mang có khả năng liên kết cần thiết theo các tỷ lệ thích hợp và được nén thành hình dạng và cỡ mong muốn.

Chất mang thích hợp dùng cho bột và viên nén gồm magie cacbonat, magie stearat, đá tan, đường, lactoza, pectin, dextrin, tinh bột, gelatin, tragacan,

metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, sáp nóng chảy thấp, bơ cacao, và các chất mang tương tự. Thuật ngữ "dạng bào chế" được dùng để bao gồm chế phẩm chứa hợp chất hoạt tính với vật liệu bao nang là chất mang tạo ra viên nang trong đó thành phần hoạt tính, có hoặc không có chất mang, được bao quanh bởi chất mang, được kết hợp với nó theo cách đó. Tương tự, bao gồm cả viên nhộng và viên thuốc hình thoi. Viên nén, bột, viên nang, viên thuốc, viên nhộng, và viên thuốc hình thoi có thể được sử dụng dưới dạng rắn thích hợp để sử dụng qua đường miệng.

Để điều chế thuốc đạn, sáp nóng chảy thấp, như hỗn hợp của glyxerit của axit béo hoặc bơ cacao, trước hết được nấu chảy và thành phần hoạt tính được phân tán đồng nhất trong đó, như bằng cách khuấy. Hỗn hợp đồng nhất nóng chảy tiếp đó được đổ vào khuôn có cỡ thuận tiện, để làm mát, và cũng là để hóa rắn.

Các chế phẩm thích hợp để sử dụng trong âm đạo có thể có trong vòng tránh thai, băng vệ sinh, kem, gel, miếng dán, bột hoặc chất lỏng dạng bụi chứa thêm hoạt chất như chất mang thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Chế phẩm dạng lỏng gồm dung dịch, hỗn dịch, và nhũ tương, ví dụ, nước hoặc dung dịch nước-propylen glycol. Ví dụ, chế phẩm lỏng tiêm ngoài đường tiêu hóa có thể được bào chế dưới dạng dung dịch trong 1,2-propandiol chứa nước, dimetylsulfoxit (DMSO), dung dịch chứa nước chứa gama xyclodextrin hoặc 2-hydroxypropyl-beta-yclodextrin, dung dịch nước muối hoặc dung dịch polyetylen glycol, có hoặc không có dung dịch đệm. Khoảng ưu tiên có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,5. Dung dịch đệm thích hợp đệm chế phẩm ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,5 và gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch axetat và dung dịch đệm xitrat.

Hợp chất theo sáng chế do đó có thể được bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ bằng cách tiêm, ví dụ tiêm bolus hoặc truyền liên tục) và có thể được thể hiện dưới dạng liều đơn vị trong các ống thuốc tiêm, ống tiêm được làm đầy trước,

truyền thể tích nhỏ hoặc vật chứa đa liều với chất bảo quản bổ sung. Các chế phẩm có thể có các dạng như hỗn dịch, dung dịch, hoặc nhũ tương trong chất mang dạng dầu hoặc chứa nước, và có thể chứa các chất bảo chế như chất tạo hỗn dịch, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Nói cách khác, hoạt chất có thể có dạng bột, thu được bằng cách phân lập vô trùng chất rắn khử trùng hoặc bằng cách làm khô lạnh từ dung dịch, để cấu thành bởi chất mang thích hợp, ví dụ nước không chứa pyrogen, vô trùng trước khi sử dụng.

Dung dịch chứa nước thích hợp để sử dụng qua đường miệng có thể được điều chế bằng cách hòa tan thành phần hoạt tính trong nước và bổ sung thuốc nhuộm màu, hương vị, chất ổn định và chất gây lắng thích hợp, như mong muốn.

Hỗn dịch chứa nước thích hợp để sử dụng qua đường miệng có thể được tạo thành bằng cách phân tán thành phần hoạt tính rất nhỏ mịn trong nước bằng vật liệu dính, như gồm tự nhiên hoặc tổng hợp, như, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, hoặc các chất tạo hỗn dịch đã biết khác.

Ngoài ra, sáng chế cũng bao gồm các dạng bào chế dạng rắn mà được dùng để biến đổi, ngay trước khi sử dụng, thành các chế phẩm dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng. Các dạng chất lỏng này gồm dung dịch, hỗn dịch, và nhũ tương. Các chế phẩm này có thể chứa, ngoài thành phần hoạt tính, thuốc nhuộm màu, hương liệu, chất ổn định, dung dịch đậm, chất tạo ngọt tự nhiên và nhân tạo, chất phân tán, chất gây lắng, chất hòa tan, và các chất tương tự.

Để sử dụng khu trú trong biểu bì hoặc cơ quan khác, các hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng gel, thuốc mỡ, nhũ tương, thuốc nhão, kem hoặc kem dưỡng ẩm, hoặc dưới dạng miếng dán qua chân bì. Gel có thể được điều chế bằng cách sử dụng các chất gây lắng thích hợp và bổ sung chúng vào chế phẩm trong nước/có rượu. Chất gây lắng hoặc chất keo hóa đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như polyme polyvinyl carboxy, Carbomer 940. Thuốc mỡ và kem có thể, ví dụ, được bào

chế với bazơ chứa nước hoặc dạng dầu bằng cách bổ sung chất gây lắng và/hoặc chất keo hóa thích hợp. Kem dưỡng ẩm có thể được bào chế bằng bazơ chứa nước hoặc dạng dầu và thường sẽ chứa một hoặc nhiều chất nhũ hóa, chất làm ổn định, chất phân tán, chất tạo hỗn dịch, chất gây lắng, hoặc phẩm nhuộm.

Chế phẩm thích hợp để sử dụng khu trú cũng bao gồm dung dịch hoặc hỗn dịch mà có thể được sử dụng khu trú dưới dạng dung dịch ngâm hoặc dung dịch tắm hoặc dung dịch xịt. Các chế phẩm này có thể được bôi để chống lại các kích ứng trên da, vết cắn của côn trùng và các vết thương ở bàn chân.

Các chế phẩm thích hợp để sử dụng khu trú trong miệng bao gồm viên thuốc hình thoi chứa hoạt chất trong bazơ có hương vị, thường là sucroza và gôm acacia hoặc tragacan; viên ngâm chứa hoạt chất trong bazơ trơ như gelatin và glycerin hoặc sucroza và gôm acacia; và thuốc sát trùng để súc miệng chứa hoạt chất trong chất mang lỏng thích hợp.

Dung dịch hoặc hỗn dịch được bôi trực tiếp vào khoang mũi bằng các dụng cụ thông thường, ví dụ bằng ống nhỏ giọt, ống hút hoặc bình phun. Các chế phẩm có thể được tạo ra dưới dạng liều đơn hoặc đa liều. Trong trường hợp dạng đa liều của ống nhỏ giọt hoặc ống hút, dạng này có thể được ứng dụng bằng cách cho bệnh nhân sử dụng một thể tích thích hợp, xác định trước chứa dung dịch hoặc hỗn dịch. Trong trường hợp dung dịch xịt, dạng này có thể sử dụng ví dụ bằng bơm phun do nguyên tử hóa. Để cải thiện sự phân phối và lưu giữ trong mũi, các hợp chất theo sáng chế có thể được bao nang bằng xyclodextrin, hoặc được bào chế bằng các chất của chúng được mong đợi để tăng cường sự phân phối và lưu giữ trong niêm mạc mũi.

Việc sử dụng cho đường hô hấp cũng có thể sử dụng bằng chế phẩm sol khí trong đó hoạt chất được tạo ra trong gói được điều áp bằng nhiên liệu phun khí thích hợp như cloflocacbon (CFC) ví dụ, diclodiflometan, tricloflometan, hoặc diclotetrafloetan, cacbon dioxit, hoặc khí thích hợp khác. Bình xịt cũng có thể chứa

chất hoạt động bề mặt như lexithin. Liều lượng thuốc có thể được kiểm soát bằng cách cung cấp van đồng hồ đo.

Nói cách khác, các hoạt chất này có thể được cung cấp dưới dạng bột khô, ví dụ hỗn hợp bột chứa hợp chất trong bazơ bột thích hợp như lactoza, tinh bột, dẫn xuất của tinh bột như hydroxypropylmetyl xenluloza và polyvinylpyrrolidon (PVP).

Rất thuận tiện là chất mang bột sẽ tạo thành gel trong khoang mũi. Chế phẩm bột có thể ở dạng liều đơn vị, ví dụ như trong viên nang hoặc hộp chứa, ví dụ, gelatin, hoặc bao bì xộp mà từ đó bột có thể được sử dụng bằng ống hít.

Trong các chế phẩm được dùng để sử dụng cho đường hô hấp, bao gồm chế phẩm trong mũi, hợp chất thường sẽ có cỡ hạt nhỏ ví dụ theo thứ tự nằm trong khoảng từ 1 đến 10 micron hoặc nhỏ hơn. Cỡ hạt như vậy có thể thu được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ bằng phương pháp micron hóa.

Sáng chế hiện tại sẽ được mô tả bằng các ví dụ sau đây để minh họa một số khía cạnh được ưu tiên theo sáng chế. Tuy nhiên, nên được hiểu rằng tính cụ thể của phần mô tả dưới đây theo sáng chế không dùng để thay thế nguyên tắc chung của phần mô tả trước đó của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chất chiết thực vật

Tất cả các chất chiết thực vật được điều chế bằng cách cắt nhỏ vật liệu thực vật và chiết với etanol với tỷ lệ gần đúng bằng 1 phần vật liệu thực vật đến khoảng từ 2 đến 5 phần etanol (trọng lượng/trọng lượng). Chất chiết được giữ qua đêm ở nhiệt độ 4°C và tiếp đó phần nổi trên bề mặt được gạn và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng.

Sự có mặt của các hợp chất epoxy-tiglian trong chất chiết thực vật được xác nhận bởi LCMSMS bằng cách sử dụng Shimadzu HPLC được kết hợp với khối phổ kế mạch bốn cực bộ ba ABI3200. Cột C18 halo amit được sử dụng để tách các hợp chất trong hỗn hợp, bằng cách sử dụng hỗn hợp axetonitril/nước làm hệ dung môi.

Hầu hết các mẫu được chạy bằng phương pháp KinC18Gen, bằng cách sử dụng cột C18 Kinetix 4,6 mm x100 mm 2,6 micron C18:

Axetonitril: 55% 60% 75% 100% 100% 55%

Phút: 0 2,5 15 15,1 17,5 17,6

Một số mẫu được chạy bằng phương pháp Amide Long bằng cách sử dụng cột Halo amit RP 4,6 mm x 150 mm, 2,7 micron, từ Advanced Materials Technology:

Axetonitril: 45% 58% 95% 95% 45% 45%

Phút: 0 13 20 24 24,1 27

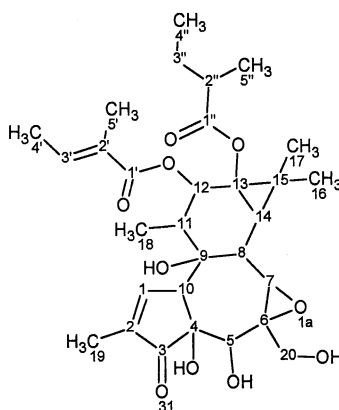
Ví dụ 2: Tách và làm sáng tỏ các hợp chất epoxy-tiglian

Các hợp chất được tinh chế từ các hạt *Fontainea picrosperma* bằng cách chiết, và phương pháp sắc ký trên silicagel tiếp theo phương pháp HPLC điều chế (cột C18, hỗn hợp dung môi metanol/nước) bằng cách sử dụng các phương pháp chung được mô tả dưới đây.

Khoảng từ 1 đến 2 kg vật liệu thực vật (lá, quả, hạt, cuống, rễ, hoa, vỏ hoặc thân gỗ) được cắt nhỏ, được chiết bằng 2 phần etanol (trọng lượng/thể tích) ba lần, chất chiết được kết hợp, được làm bay hơi và cặn được chia thành nhiều phần giữa nước và dung môi hữu cơ không thể trộn lẫn (thường là nhiên liệu lỏng dầu mỏ bp 40-60 (PE) hoặc etyl axetat EtOAc). Cặn từ sự bay hơi dung môi hữu cơ được chạy sắc ký trên silicagel trong hỗn hợp dung môi có độ phân cực tăng, khởi đầu bằng PE hoặc heptan và tiến đến EtOAc và tiếp đó là metanol. Các phần cắt từ silicagel tiếp đó được tinh chế bằng HPLC điều chế trên cột C18 thường sử dụng gradien metanol-nước. Các phần cắt sau đó được phân tích về hoạt tính sinh học, được gộp chung

theo thời gian lưu giữ các hợp chất được tìm thấy bằng HPLC phân tích, và phụ thuộc vào phương pháp HPLC tiếp theo để thu được các hợp chất tinh khiết. Mỗi hợp chất được thử nghiệm sinh học và cấu trúc của nó được xác nhận bằng UV, NMR và các kỹ thuật phổ khối.

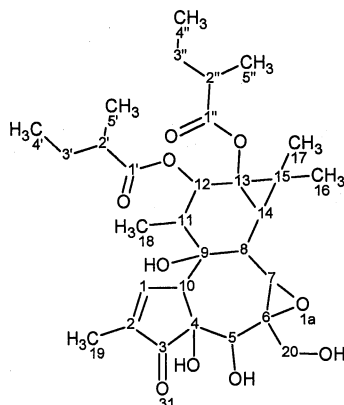
Hợp chất 1: 12-tigloyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,3$ Hz), 1,11 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,21 (3H (16), s), 1,24 (3H (17), s), 1,26 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,43 (1H (3''), m, $J=14,1, 7,3, 7,2$ Hz), 1,69 (1H (3''), m), 1,73 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,5$ Hz), 1,77 (3H (4'), dd, $J=7,1, 1,2$ Hz), 1,8 (3H (5'), d, $J=1,5$ Hz), 1,94 (1H (11), m), 2,37 (1H (2''), qt, $J=7,0, 6,8$ Hz), 3,17 (1H (8), d), 3,26 (1H (7), s), 3,69 (1H, OH, br,s), 3,80, (1H (20), d, $J=12,7$ Hz), 3,83 (1H (20), d, $J=12,2$ Hz), 4,06 (1H (10), t, $J=2,7$ Hz), 4,22 (1H (5), s), 5,42 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 6,02 (1H, OH, br,s), 6,79 (1H (3'), m, $J=7,2, 7,0, 1,2$ Hz), 7,71 (1H, (1), dd),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 12,2 (5'), 14,4 (4'), 15,1 (18), 16,1 (5''), 17,2 (16), 23,6 (17), 26,1 (3''), 26,6 (15), 36,0 (8), 36,1 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 48,9 (10), 61,8 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,3 (5), 72,4 (4), 76,7 (12), 77,2 (9), 128,4 (2'), 133,4 (2), 137,6 (3'), 164,7 (1), 167,4 (1'), 178,9 (1''), 209,9 (3).

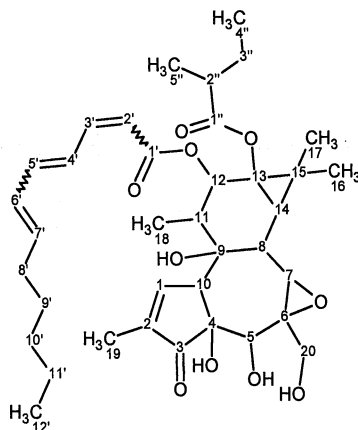
Hợp chất 2: 12,13-di-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,89 (3H (4''), $J=7,3$ Hz), 0,91 (3H (4'), t, $J=7,8$ Hz), 1,11 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,12 (3H (5'), d, $J=6,8$ Hz), 1,21 (3H (17), s), 1,22 (3H (16), s), 1,26 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,44 (1H (3'), td, $J=13,9, 7,3$ Hz), 1,44 (1H (3''), td, $J=13,9, 7,3$ Hz), 1,63 (1H (3'), dd, $J=7,8, 5,9$ Hz), 1,69 (1H (3''), dd, $J=13,9, 7,1$ Hz), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,7, 1,2$ Hz), 1,90 (1H (11), dd, $J=10,0, 6,6$ Hz), 2,36 (1H (2'), q, $J=7,0$ Hz), 2,36 (1H (2''), q, $J=7,0$ Hz), 3,16 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,61 (1H (OH), m), 3,78 (1H (20), m, $J=12,7$ Hz), 3,85 (1H (20), d, $J=12,2$ Hz), 4,06 (1H (10), t, $J=2,7$ Hz), 4,22 (1H (5), s), 5,40 (1H (12), d, $J=10,3$ Hz), 5,98 (1H (9-OH), m), 7,71 (1H (1), dd, $J=2,4, 1,5$ Hz),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4'), 11,6 (4''), 15,0 (18), 16,1 (5''), 17,0 (5'), 17,2 (17), 23,7 (16), 26,2 (3''), 26,5 (15), 26,7 (3'), 36,0 (8), 36,0 (14), 41,2 (2''), 41,8 (2'), 45,5 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,2 (12), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,7 (1), 175,9 (1'), 178,8 (1''), 209,9 (3).

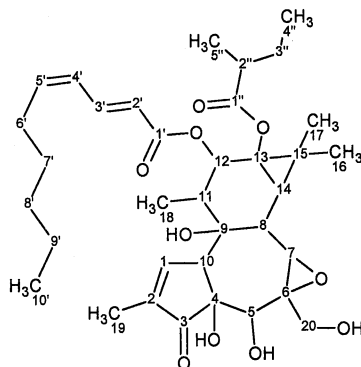
Hợp chất 3: 12-[(2E,4E,6E)-dodeca-2,4,6-trienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20- hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d, $J=7,0$ Hz), 0,87 (3H (12'), m, $J=7,0$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,22 (3H (17), s), 1,24 (3H (16), s), 1,26 (2H (10'), m), 1,27 (1H (14), m), 1,29 (2H (11'), m), 1,39 (2H (9'), m), 1,45 (1H (3''), dd, $J=14,1, 7,0$ Hz), 1,71 (1H (3''), m), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,2$ Hz), 1,95 (1H (11), dq), 2,12 (2H (8'), q), 2,38 (1H (2''), sxt, $J=7,0$ Hz), 3,17 (1H (8), d, $J=6,7$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,57 (1H, (4-OH), s), (3,78 (1H (20), m), 3,86 (1H (20), m), 4,06 (1H (10), d, $J=2,7$ Hz), 4,22 (1H (5), s), 5,41 (1H (12), d), 5,79 (1H (2'), d, $J=15,2$ Hz), 5,92 (1H (7'), dt, $J=15,2, 7,2$ Hz), 6,04 (1H (OH), m), 6,11 (1H (6'), dd, $J=15,1, 10,7$ Hz), 6,19 (1H (4'), dd, $J=14,8, 11,2$ Hz), 6,51 (1H (5'), dd, $J=14,9, 10,7$ Hz), 7,23 (1H (3'), dd, $J=15,5, 10,9$ Hz), 7,72 (1H (1), dd, $J=2,4, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,0 (12'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (16), 22,5 (11'), 23,6 (17), 26,2 (3''), 26,7 (15), 28,6 (9'), 31,4 (10'), 33,0 (8'), 36,0 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 48,9 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,6 (5), 72,4 (4), 76,7 (9), 77,1 (12), 119,5 (2'), 127,5 (4'), 129,7 (6'), 133,5 (2), 141,1 (7'), 141,7 (5'), 145,3 (3'), 164,8 (1), 166,6 (1'), 170,0 (1''), 210,0 (3).

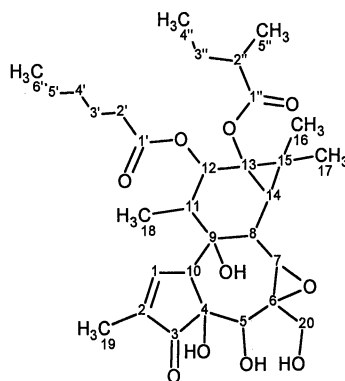
Hợp chất 4: 12-[(2E,4Z)-deca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,87 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,87 (3H (10'), s), 0,93 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,13 (3H (5''), d, $J=7,1$ Hz), 1,23 (3H (16), s), 1,25 (3H (17), s), 1,27 (1H (14), d, $J=1,6$ Hz), 1,27 (2H (9'), m), 1,30 (2H (8'), m), 1,40 (2H (7'), m), 1,46 (1H (3''), dd, $J=14,2, 6,9$ Hz), 1,71 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,95 (1H (11), d, $J=3,3$ Hz), 2,11 (1H (20-OH), m), 2,26 (2H (6'), m), 2,38 (1H (2''), q, $J=7,0$ Hz), 3,18 (1H (8), d, $J=6,6$ Hz), 3,28 (1H (7), s), 3,53 (1H (4-OH), d, $J=0,9$ Hz), 3,77 (1H (20), m), 3,81 (1H (5-OH), d, $J=2,8$ Hz), 3,87 (1H (20), dd, $J=12,4, 7,6$ Hz), 4,06 (1H (10), d, $J=2,7$ Hz), 4,22 (1H (5), d, $J=1,7$ Hz), 5,43 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,83 (1H (2'), d, $J=15,2$ Hz), 5,86 (1H (5'), ddd, $J=10,8, 7,9, 7,8$ Hz), 6,03 (1H (9-OH), m), 6,10 (1H (4'), td, $J=11,2, 0,7$ Hz), 7,56 (1H (3'), ddd, $J=15,3, 11,7, 1,1$ Hz), 7,72 (1H (1), dd, $J=2,5, 1,4$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,0 (10'), 15,2 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 22,5 (9'), 23,7 (16), 26,2 (3''), 26,7 (15), 28,3 (6'), 29,0 (7'), 31,4 (8'), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 76,8 (12), 77,1 (9), 120,8 (2'), 126,4 (4'), 133,5 (2), 140,0 (3'), 142,2 (5'), 164,8 (1), 166,6 (1'), 179,0 (1''), 210,0 (3),

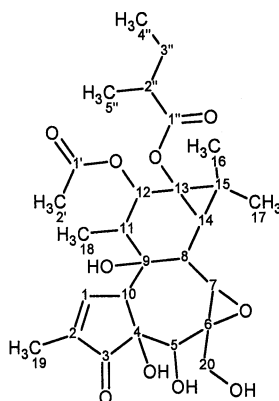
Hợp chất 5: 12-hexanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,5$ Hz), 0,87 (3H (6'), t, $J=7,0$ Hz), 0,91 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,11 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,21, (3H (16), s), 1,21, (3H (17), s), 1,25 (1H (14), d, $J=6,6$ Hz), 1,43 (1H (3''), m, $J=14,1, 7,4, 7,1$ Hz), 1,60 (2H (3'), quin, $J=7,4$ Hz), 1,70 (1H (3''), ddd, $J=13,9, 7,3, 7,1$ Hz), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,9 (1H (11), dq, $J=10,0, 6,5$ Hz), 2,27 (2H (2'), dt, $J=7,4, 3,7$ Hz), 1,29 (2H (4'), m, $J=7,5, 7,2, 3,9$ Hz), 1,29 (2H (5'), m, $J=7,5, 7,2, 3,9$ Hz), 2,36 (1H (2''), sxt, $J=7,0$ Hz), 3,14 (1H (8), d, $J=6,6$ Hz), 3,25 (1H (7), s), 3,64 (1H, (OH), s), 3,83 (1H (OH), dd, $J=12,5, 7,9$ Hz), 3,79 (2H (20), dd, $J=12,5, 5,7$ Hz), 3,94, (1H (OH), d, $J=2,5$ Hz), 4,06 (1H (10), t, $J=2,6$ Hz), 4,22 (1H (5), s), 5,37 (1H (12), d, $J=10,0$ Hz), 5,95 (1H (OH), br. s.) 7,7 (1H (1), dd, $J=2,4, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 13,9 (6'), 15,0 (18), 16,1 (5''), 17,1 (16), 22,3 (5'), 23,6 (17), 24,9 (3'), 26,2 (3''), 26,6 (15), 31,1 (4'), 34,5 (2'), 35,96 (8), 36,04 (14), 41,2 (2''), 45,6 (11), 48,9 (10), 61,8 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,4 (5), 72,4 (4), 76,5 (12), 77,1 (9), 133,4 (2), 164,6 (1), 173,3 (1'), 178,8 (1''), 209,9 (3),

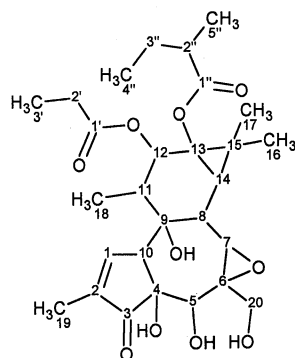
Hợp chất 6: 12-axetyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,6$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,21 (3H (16), s), 1,23 (3H (17), s), 1,25 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,44 (1H (3''), m, $J=14,1, 7,3, 7,2$ Hz), 1,71 (1H (3''), dd), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,0$ Hz), 1,91 (1H (11), m), 2,04 (3H (2'), s), 2,36 (1H (2''), m, $J=7,0, 6,8$ Hz), 3,14 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,78 (1H (20), d, $J=12,7$ Hz), 3,85 (1H (20), d, $J=12,7$ Hz), 4,04 (1H (10), t, $J=2,7$ Hz), 4,21 (1H (5), s), 5,33 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 7,7 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,1 (16), 21,0 (2'), 23,7 (17), 26,2 (3''), 26,7 (15), 36,0 (8), 36,1 (14), 41,2 (2''), 45,7 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,4 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,8 (9), 77,1 (12), 133,5 (2), 164,6 (1), 170,6 (1'), 178,9 (1''), 209,9 (3).

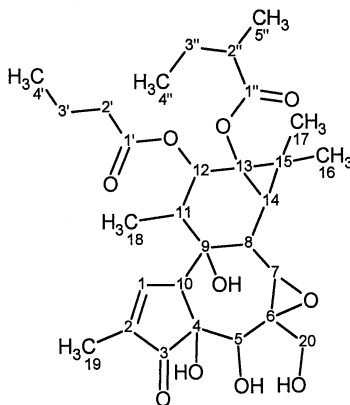
Hợp chất 7: 12-propanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=6,8$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,6$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,3$ Hz), 1,13 (3H (3'), t), 1,21 (3H (16), s), 1,22 (3H (17), s), 1,25 (1H (14), dd, $J=10,3, 6,8$ Hz), 1,44 (1H (3''), m $J=14,0, 7,0, 6,6$ Hz), 1,70 (1H (3''), dd, $J=14,2, 6,8$ Hz), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,5$ Hz), 1,91 (1H (11), m), 2,31 (2H (2'), m), 2,37 (1H (2''), dd, $J=13,7, 6,8$ Hz), 3,15 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,78 (1H (20), d, $J=12,2$ Hz), 3,84 (1H (20), d, $J=12,7$ Hz), 4,05 (1H (10), m), 4,21 (1H (5), s), 5,35 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 5,92 (1H (OH), br,s), 7,71 (1H (1), m).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,3 (3'), 9,7 (19), 11,6 (4''), 15,1 (18), 16,1 (5''), 17,1 (16), 23,7 (17), 26,2 (3''), 26,7 (15), 27,8 (2'), 36,0 (8), 36,1 (14), 41,2 (2''), 45,7 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,4 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,8 (12), 77,1 (9), 133,5 (2), 164,6 (1), 173,9 (1'), 178,9 (1''), 209,9 (3).

Hợp chất 8: 12-butanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on

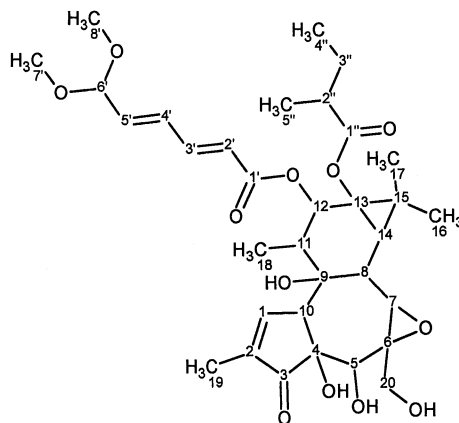


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,6$ Hz), 0,94 (3H (4'), t, $J=7,3$ Hz), 1,12 (3H (5''), d), 1,22 (3H (16), s), 1,23 (3H (17), s), 1,26 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,45 (1H (3''), dq, $J=14,0, 7,1$ Hz), 1,64 (2H (3'), m, $J=14,6, 7,2, 7,1$ Hz), 1,71 (1H (3''), dd, $J=13,7, 6,8$ Hz), 1,75 (3H (19), d, $J=2,9$ Hz), 1,90 (1H (11), dd, $J=10,0, 6,6$ Hz), 2,27 (2H (2'), m), 2,37 (1H (2''), qt, $J=7,0, 6,8$ Hz), 3,15 (1H (8), d, $J=6,4$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,77 (1H (20), m, $J=12,2$ Hz),

3,86 (1H (20), m, $J=12,7$ Hz), 4,05 (1H (10), d, $J=2,4$ Hz), 4,21 (1H (5), s), 7,71 (1H (1), dd, $J=2,4, 1,0$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 13,5 (4'), 15,1 (18), 16,1 (5''), 17,1 (16), 18,7 (3'), 23,7 (17), 26,2 (3''), 26,6 (15), 36,0 (8), 36,1 (14), 36,4 (2'), 41,2 (2''), 45,6 (11), 48,9 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 76,6 (12), 77,1 (9), 133,5 (2), 164,7 (1), 173,1 (1'), 178,8 (1''), 209,9 (3).

Hợp chất 9: 12-[(2E,4E)-(6,6-dimethoxyhexa-2,4-dienoyl)-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglicien-3-on

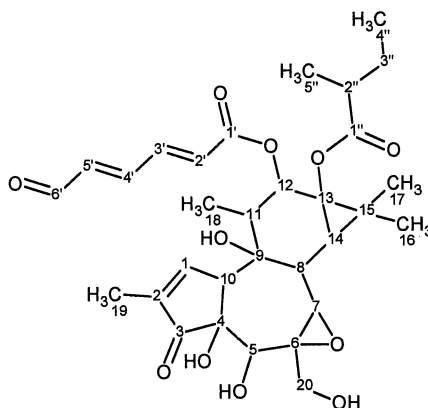


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,3$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,22 (3H (17), s), 1,24 (3H (16), s), 1,27 (1H (14), dd, $J=11,2, 6,8$ Hz), 1,44 (1H, (3''), m), 1,72 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,5$ Hz), 1,96 (1H (11), dd, $J=10,0, 6,6$ Hz), 2,37 (1H (2''), m), 3,17 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,31 (3H (7'), s), 3,31 (3H (8'), s), 3,79, (1H (20), m, $J=12,2$ Hz), 3,86 (1H (20), m), 4,06 (1H (10), br. s.), 4,22 (1H (5), d, $J=2,4$ Hz), 4,89 (1H (6'), dd, $J=4,4, 1,0$ Hz), 5,42 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 5,91 (1H (2'), d, $J=15,7$ Hz), 5,98 (1H (5'), dd, $J=15,7, 4,4$ Hz), 6,47 (1H (4'), dd, 15,6, 11,2 Hz), 7,21 (1H (3'), dd, $J=15,6, 11,2$ Hz), 7,71 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 23,6 (16), 26,2 (3''), 26,8 (15), 36,0 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,8 (11), 48,9 (10), 52,7 (7'), 52,7 (8'), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,4 (13), 71,6 (5), 72,4 (4),

77,1 (9), 77,1 (12), 101,3 (6'), 122,8 (2'), 131,0 (4'), 133,5 (2), 137,9 (5'), 143,4 (3'), 164,7 (1), 166,1 (1'), 178,9 (1''), 209,9 (3).

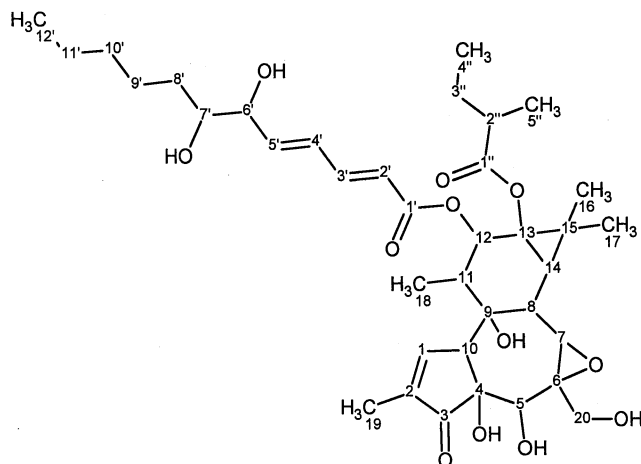
Hợp chất 10: 12-[(2E,4E)-6-oxohexa-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,88 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,93 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,13 (3H (5''), d, $J=7,1$ Hz), 1,24 (3H (17), s), 1,25 (3H (16), s), 1,28 (1H (14), m), 1,46 (1H (3''), td, $J=14,1, 7,3$ Hz), 1,70 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,2$ Hz), 1,99 (1H (11), dddd, $J=9,8, 6,5, 6,4, 6,1$ Hz), 2,38 (1H (2''), d, $J=6,8$ Hz), 3,19 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,28 (1H (7), s), 3,77 (1H (20), m, $J=12,5$ Hz), 3,87 (1H (20), d, $J=13,0$ Hz), 4,06 (1H (10), d, $J=2,7$ Hz), 4,22 (1H (5), s), 5,46 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 6,28 (1H (2'), d, $J=15,4$ Hz), 6,40 (1H (5'), dd, $J=15,4, 7,8$ Hz), 7,14 (1H (4'), dd, $J=14,9, 11,2$ Hz), 7,36 (1H (3'), dd, $J=15,4, 11,2$ Hz), 7,71 (1H (1), dd, $J=2,6, 1,3$ Hz), 9,66 (1H (6'), d, $J=7,6$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 15,2 (18), 16,2 (5''), 17,2 (16), 23,6 (17), 26,2 (3''), 26,9 (15), 36,0 (8), 36,3 (14), 41,2 (2''), 45,8 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,1 (7), 65,3 (13), 71,6 (5), 72,3 (4), 77,1 (9), 78,2 (12), 129,4 (2'), 133,6 (2), 137,2 (5'), 140,8 (3'), 146,9 (4'), 164,4 (1), 165,0 (1'), 178,9 (1''), 192,8 (6'), 209,8 (3).

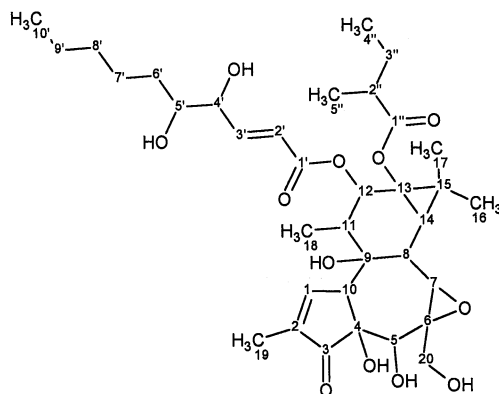
Hợp chất 11: 12-[(2E,4E)-6,7-dihydroxydodeca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,87 (3H (18), d, $J=2,0$ Hz), 0,87 (3H (12'), d, $J=2,0$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,3$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,22 (3H (17), s), 1,24 (3H (16), s), 1,28 (1H (14), d, $J=6,4$ Hz), 1,28 (2H (11'), d, $J=6,4$ Hz), 1,44 (2H (8'), d, $J=6,8$ Hz), 1,46 (1H (3''), d, $J=6,8$ Hz), 1,47 (2H (9'), d, $J=2,9$ Hz), 1,69 (1H (3''), m), 1,76 (3H (19), m), 1,95 (1H (11), dd, $J=9,5, 6,6$ Hz), 2,38 (1H (2''), dq, $J=13,7, 6,8$ Hz), 3,17 (1H (8), d, $J=6,4$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,49 (1H (7'), br. s.), 3,60 (1H (OH), s), 3,82 (2H (20),), 4,03 (1H (6'), m), 4,06 (1H (10), br. s.), 4,22 (1H (5), d, $J=2,9$ Hz), 5,42 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 5,88 (1H (2'), d, $J=15,2$ Hz), 6,08 (1H (OH), t, $J=6,1$ Hz), 6,11 (1H (5'), t, $J=6,1$ Hz), 6,43 (1H (OH), m), 6,47 (1H (4'), m), 7,21 (1H (OH), dd, $J=13,2, 2,0$ Hz), 7,24 (1H (3'), s), 7,71 (1H (1), s),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,0 (12'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (16), 22,6 (11'), 23,6 (17), 25,3 (9'), 26,2 (3''), 26,8 (15), 31,7 (10'), 33,1 (8'), 36,0 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,8 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,4 (13), 71,6 (5), 72,4 (4), 74,5 (7'), 75,1 (6'), 77,1 (9), 77,1 (12), 133,5 (2), 121,8 (2'), 129,7 (4'), 141,6 (5'), 143,8 (3'), 164,6 (1), 166,2 (1'), 178,9 (1''), 209,9 (3).

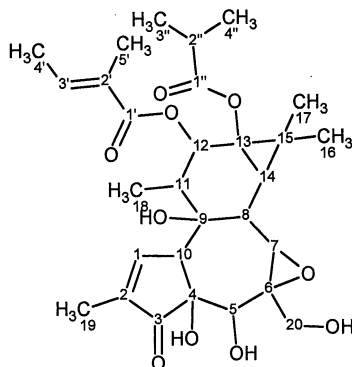
Hợp chất 12: 12-[(2E)-4,5-dihydroxy-deca-2-enoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglicien-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d), 0,87 (3H (10'), t), 0,93 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,22 (3H (17), s), 1,23 (3H (16), s), 1,26 (2H (9'), m), 1,27 (1H (14), m), 1,28 (2H (8'), m), 1,30 (1H (7'), m), 1,42 (2H (6'), m), 1,44 (1H (3''), m), 1,46 (1H (7'), m), 1,70 (1H (3''), m), 1,74 (3H (19), d, $J=1,6$ Hz), 1,95 (1H (11), m), 2,37 (1H (2''), m), 3,16 (1H (8), d, $J=6,5$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,75 (1H (5'), m), 3,77 (1H (20), m), 3,85 (1H (20), d, $J=19,3$ Hz), 4,05 (1H (10), br. s.), 4,21 (1H (5), s), 4,32 (1H (4'), m), 5,41 (1H (12), d, $J=9,5$ Hz), 6,11 (1H (2'), dd, $J=8,8, 1,8$ Hz), 6,92 (1H (3'), dd, $J=4,9, 1,6$ Hz), 7,71 (1H (1), dd).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14 (10'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (16), 22,5 (9'), 23,7 (17), 25,5 (7'), 26,2 (3''), 26,8 (15), 31,7 (8'), 32,0 (6'), 36,0 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,8 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,4 (13), 71,6 (5), 72,3 (4), 73,9 (4'), 74,1 (5'), 77,1 (12), 77,3 (9), 122,5 (2'), 133,6 (2), 145,9 (3'), 164,6 (1), 165,5 (1'), 179 (1''), 209,9 (3).

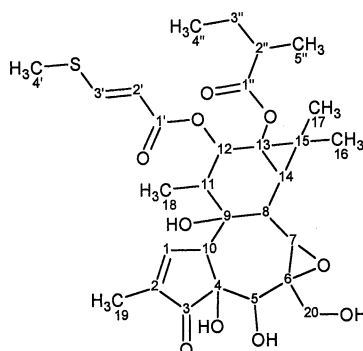
Hợp chất 13: 12-tigloyl-13-(2-methylpropanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 1,14 (3H (4''), d, $J=7,3$ Hz), 1,17 (3H (3''), d, $J=6,8$ Hz), 1,22 (3H (16), s), 1,24 (3H (17), s), 1,28 (1H (8), m), 1,74 (3H (19), s), 1,77 (3H (4'), d, $J=7,3$ Hz), 1,95 (1H (11), dd, $J=10,0, 6,6$ Hz), 2,56 (1H, (2''), m, $J=7,3, 7,1, 7,0$ Hz), 3,16 (1H (14), d, $J=6,4$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,82 (2H (20), m), 4,06 (1H (10), br. s.), 4,22 (1H (5), d, $J=2,4$ Hz), 5,41 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 6,80 (1H (3'), m), 7,71 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 12,2 (5'), 14,4 (4'), 15,1 (18), 17,2 (17), 18,5 (3''), 18,6 (4''), 23,7 (16), 26,5 (15), 34,1 (2''), 36,0 (8), 36,1 (14), 45,8 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,4 (5), 72,4 (4), 76,6 (12), 77,2 (9), 128,4 (2'), 133,4 (2), 137,6 (3'), 164,7 (1), 167,5 (1'), 179,3 (1''), 209,9 (3).

Hợp chất 14: 12-[(2E)-3-methylthioprop-2-enoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglicien-3-on

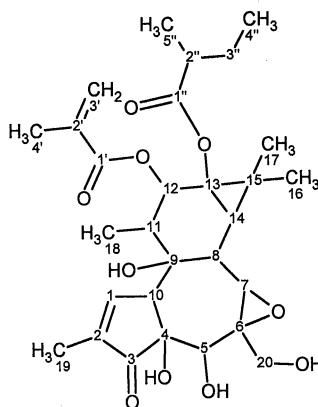


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,3$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,23 (3H (17), s), 1,24 (3H (16), s), 1,27 (1H

(14), d, $J=6,8$ Hz), 1,44 (1H (3''), m), 1,71 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), s), 1,94 (1H (11), m), 2,14 (1H (OH), t, $J=5,9$ Hz), 2,32 (3H (4'), s), 2,38 (1H (2''), m), 3,16 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,55 (1H (4-OH), s), 3,78 (1H (20), dd, $J=12,7$, 5,9 Hz), 3,84 (1H (5-OH), s), 3,85 (1H (20), s), 4,05 (1H (10), m), 4,21 (1H (5), d, $J=2,4$ Hz), 5,41 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 5,61 (1H (2'), d, $J=14,7$ Hz), 6,02 (1H (9-OH), m), 7,69 (1H (3'), d, $J=14,7$ Hz), 7,71 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,3 (4'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (16), 23,7 (17), 26,2 (3''), 26,7 (15), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,4 (4), 76,8 (12), 77,1 (9), 112,8 (2'), 133,5 (2), 147,5 (3'), 164,5 (1'), 164,8 (1), 178,9 (1''), 210,0 (3).

Hợp chất 15: 12-(2-metylprop-2-enoyl)-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglicien-3-on

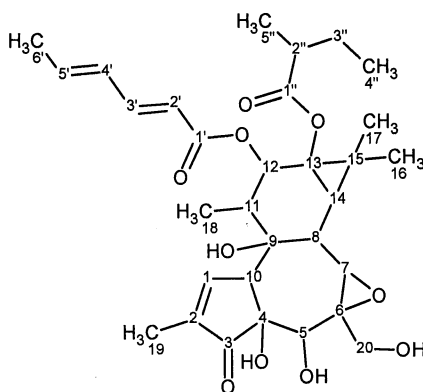


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,3$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,23 (3H (17), br. s.), 1,25 (3H (16), s), 1,27 (1H (14), dd, $J=11,2$, 6,4 Hz), 1,45 (1H (3''), m), 1,72 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9$, 1,0 Hz), 1,92 (3H (4'), s), 1,95 (1H (11), m), 2,38 (1H (2''), m), 3,18 (1H (8), d), 3,28 (1H (7), s), 3,54 (1H (OH), d, $J=1,0$ Hz), 3,78 (1H (20), m), 3,87 (1H (20), dd), 4,06 (1H (10), m), 4,22 (1H (5), d, $J=2,0$ Hz), 5,42 (1H (12), s), 5,56 (1H (3'), dt, $J=2,9$, 1,5 Hz), 6,05 (1H (3'), m), 7,72 (1H (1), dd, $J=2,4$, 1,5 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 18,5 (4'), 23,7 (16), 26,2 (3''), 26,7 (15), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9

(11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 77,1 (9), 77,3 (12), 125,8 (3'), 133,5 (2), 136,2 (2'), 164,7 (1), 166,8 (1'), 178,9 (1''), 209,9 (3).

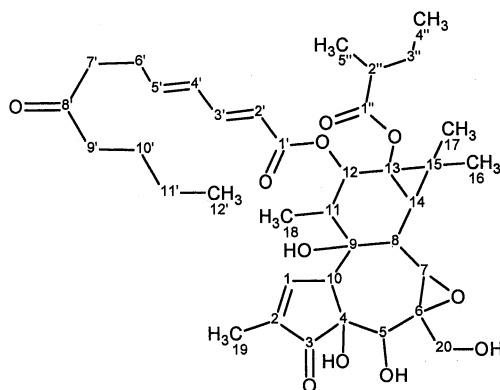
Hợp chất 16: 12-[(2E,4E)-hexa-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,87 (3H (18), d, $J=6,5$ Hz), 0,93 (3H (4''), t), 1,13 (3H (5''), m, $J=6,8$ Hz), 1,23 (3H (16), br. s.), 1,26 (3H (17), s), 1,27 (1H (14), m), 1,45 (1H (3''), s), 1,70 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,2$ Hz), 1,86 (3H (6'), dd, $J=7,3, 1,7$ Hz), 1,96 (1H (11), dd, $J=9,8, 6,2$ Hz), 2,37 (1H (2''), m), 3,18 (1H (8), d, $J=6,7$ Hz), 3,28 (1H (7), s), 3,78 (1H (20), m), 3,87 (1H (20), m), 4,06 (1H (10), br. s.), 4,21 (1H (5), br. s.), 5,44 (1H (12), d, $J=10,1$ Hz), 5,83 (1H (2'), d, $J=15,0$ Hz), 5,94 (1H (5'), m), 6,14 (1H (4'), m), 7,59 (1H (3'), ddd, $J=15,3, 11,7, 1,2$ Hz), 7,72 (1H (1), dd, $J=2,2, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,1 (6'), 15,2 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 23,7 (16), 26,2 (3''), 26,7 (15), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,4 (4), 76,8 (12), 77,1 (9), 120,7 (2'), 127,3 (4'), 133,5 (2), 136,2 (5'), 139,6 (3'), 164,8 (1), 166,6 (1'), 179,0 (1''), 210,0 (3).

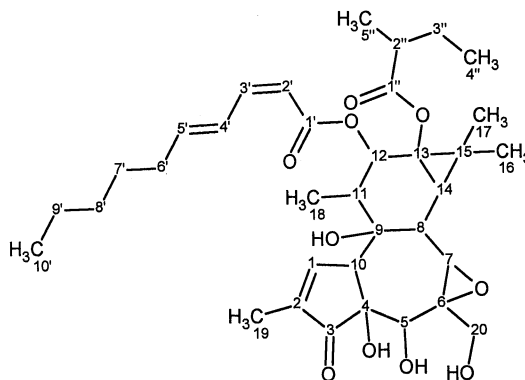
Hợp chất 17: 12-[(2E,4E)-8-oxododeca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=5,3$ Hz), 0,88 (3H (12'), t, $J=7,3$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,4$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,22 (3H (16), br. s.), 1,23 (3H (17), s), 1,26 (1H (14), d, $J=5,4$ Hz), 1,28 (2H (11'), d, $J=2,8$ Hz), 1,43 (1H (3''), br. s.), 1,53 (2H (10'), m), 1,71 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9$, 1,3 Hz), 1,95 (1H (11), m), 2,37 (1H (2''), m), 2,38 (2H (9'), d, $J=7,2$ Hz), 2,42 (2H (6'), m), 2,52 (2H (7'), s), 3,17 (1H (8), d, $J=6,6$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,53 (1H (OH), s), 3,81 (1H (20), br. s.), 3,86 (1H (20), m), 4,05 (1H (10), m), 4,22 (1H (5), d, $J=2,4$ Hz), 5,41 (1H (12), d, $J=9,8$ Hz), 5,76 (1H (2'), d, $J=15,4$ Hz), 6,09 (1H (5'), t, $J=6,8$ Hz), 6,15, (1H (4'), d, $J=10,6$ Hz), 7,16 (1H (3'), dd, $J=15,4$, 10,6 Hz), 7,71 (1H (1), dd, $J=2,6$, 1,3 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 13,8 (12'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 22,3 (11'), 23,7 (16), 25,9 (10'), 26,2 (3''), 26,7 (15), 26,9 (6'), 36,1 (8), 36,1 (14), 41,2 (2''), 41,3 (7'), 42,7 (9'), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 77,1 (12), 77,2 (9), 119,6 (2'), 129,1 (4'), 133,5 (2), 142,8 (5'), 145,0 (3'), 164,8 (1), 166,6 (1'), 179,0 (1''), 209,7 (8'), 210,1 (3).

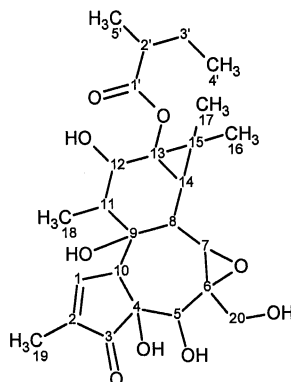
Hợp chất 18: 12-[(2Z,4E)-deca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (10'), t, $J=6,9$ Hz), 0,87 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,94 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,14 (3H (5''), d, $J=7,1$ Hz), 1,22 (3H (16), s), 1,23 (3H (17), s), 1,25 (1H (14), br. s.), 1,27 (2H (8'), br. s.), 1,28 (2H, (9'), br. s.), 1,41 (2H (7'), m), 1,46 (1H (3''), m), 1,71 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9$, 1,3 Hz), 1,94 (1H (11), dd, $J=10,0$, 6,4 Hz), 2,16 (2H (6'), s), 2,39 (1H (2''), m, $J=7,2$, 7,0 Hz), 3,16 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,53 (1H (4-OH), d, $J=0,6$ Hz), 3,77 (1H (20), dd, $J=12,7$, 5,7 Hz), 3,83 (1H (5-OH), d, $J=3,1$ Hz), 3,86 (1H (20), m, $J=12,6$, 7,7 Hz), 4,05 (1H (10), t, $J=2,7$ Hz), 4,21 (1H (5), d, $J=2,9$ Hz), 5,43 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,51 (1H (2'), d, $J=11,4$ Hz), 6,06 (1H (5'), ddd, $J=15,1$, 7,2, 6,8 Hz), 6,55 (1H (3'), t, $J=11,6$ Hz), 7,29 (1H (4'), ddd, $J=15,1$, 7,2, 6,8 Hz), 7,72 (1H (1), dd, $J=2,3$, 1,3 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,0 (10'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,1 (16), 22,5 (9'), 23,7 (17), 26,2 (3''), 26,6 (15), 28,3 (7'), 31,4 (8'), 33,0 (6'), 36,0 (14), 36,1 (8), 41,2 (2''), 45,8 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,8 (4), 76,1 (12), 77,1 (9), 115,0 (2'), 126,9 (4'), 145,9 (3'), 146,1 (5'), 133,5 (2), 164,8 (1), 165,9 (1'), 178,9 (1''), 210,0 (3).

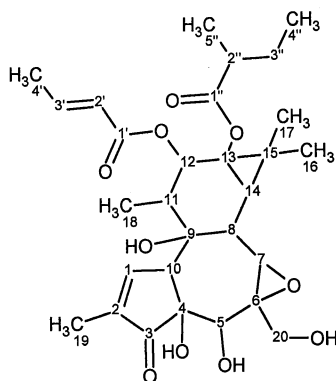
Hợp chất 19: 13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglic acid-3-on



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0,92 (3H (4'), t, J=7,6 Hz), 1,07 (3H (18), d, J=6,4 Hz), 1,16 (3H (5'), d, J=6,8 Hz), 1,20 (3H (16), s), 1,24 (1H (14), m), 1,26 (3H (17), s), 1,45 (1H (3'), ddd, J=13,8, 7,1, 7,0 Hz), 1,71 (1H (3'), dt, J=13,7, 7,3 Hz), 1,76 (1H (11), d, J=15,7 Hz), 1,77 (3H (19), dd, J=2,7, 1,2 Hz), 2,41 (1H (2'), m, J=7,0, 6,8 Hz), 3,08 (1H (8), d, J=7,3 Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,79 (1H (10), d, J=2,9 Hz), 3,81 (2H (20), m), 3,90 (1H (12), d, J=9,8 Hz), 4,20 (1H (5), s), 7,70 (1H (1), dd, J=2,4, 1,5 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,8 (19), 11,7 (4'), 16,6 (5'), 16,2 (18), 17,2 (17), 23,4 (16), 26,5 (3'), 27,9 (15), 34,8 (14), 36,5 (8), 41,0 (2'), 47,3 (11), 50,7 (10), 62,4 (6), 65,0 (20), 66,0 (7), 68,4 (13), 71,5 (5), 72,1 (4), 77,6 (9), 78,3 (12), 133,9 (2), 163,8 (1), 180,1 (1'), 209,7 (3).

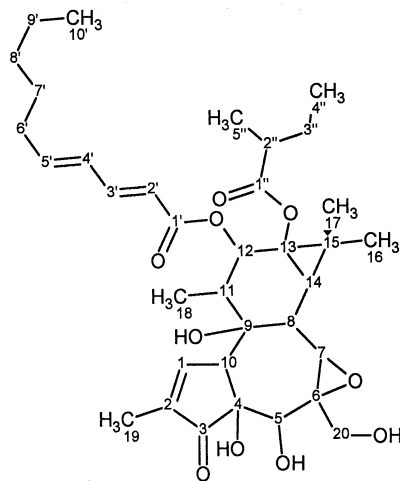
Hợp chất 20: 12-[(2E)-but-2-enoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H, (18), d, $J=6,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,1$ Hz), 1,22 (3H (17), s), 1,24 (3H (16), s), 1,26 (1H (14), d, $J=6,7$ Hz), 1,45 (1H (3''), dd, $J=14,5, 6,4$ Hz), 1,72 (1H (3''), dd, $J=14,1, 6,8$ Hz), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,3$ Hz), 1,87 (3H (4'), dd, $J=6,9, 1,7$ Hz), 1,94 (1H (11), dd, $J=9,8, 6,4$ Hz), 2,37 (1H (2''), dd, $J=13,8, 6,8$ Hz), 3,16 (1H (8), d, $J=6,5$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,78 (1H (20), d, $J=12,2$ Hz), 3,87 (1H (20), m), 4,05 (1H (10), m), 4,21 (1H (5), s), 5,40 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,81 (1H (2'), dddd, $J=15,5, 1,6, 1,5, 1,2$ Hz), 6,92 (1H (3'), dd, $J=15,5, 7,0$ Hz), 7,71 (1H (1), m).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 18,1 (4'), 23,7 (16), 26,2 (3''), 26,7 (15), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 76,7 (12), 77,1 (9), 122,6 (2'), 133,6 (2), 145,0 (3'), 164,8 (1), 166,1 (1'), 178,9 (1''), 210,2 (3).

Hợp chất 24: 12-[(2E,4E)-deca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on

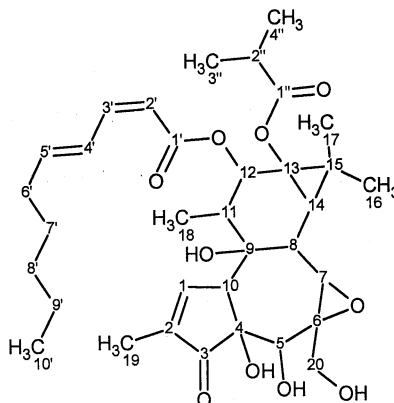


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d, $J=5,6$ Hz), 0,87 (3H (10'), d, $J=11,7$ Hz), 0,93 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,22 (3H (16), s), 1,24 (3H (17), s), 1,26 (1H (14), m), 1,26 (2H (8'), br. s.), 1,29 (2H (9'), m), 1,45 (1H (3''), m), 1,41 (2H (7'), m), 1,73 (1H (3''), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,95 (1H (11), dd, $J=9,7, 6,4$ Hz), 2,15 (2H (6'), m), 2,38 (1H (2''), m), 3,17 (1H (8),

d, $J=6,6$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,55 (1H (OH), m), 3,78 (1H (20), dd, $J=12,0, 4,6$ Hz), 3,87 (1H (20), m), 4,05 (1H (10), m), 4,22 (1H (5), m), 5,41 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,75 (1H (2'), d, $J=15,4$ Hz), 6,13 (1H (5'), dd, $J=6,7, 6,2$ Hz), 6,16 (1H (4'), s), 7,20 (1H (3'), dd, $J=15,5, 9,9$ Hz), 7,72 (1H (1), dt, $J=2,5, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,0 (10'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (17), 22,4 (9'), 23,6 (16), 26,2 (3''), 26,7 (15), 28,4 (7'), 31,3 (8'), 33,0 (6'), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 76,7 (12), 77,1 (9), 118,8 (2'), 128,3 (4'), 133,5 (2), 145,3 (5'), 145,6 (3'), 164,8 (1), 166,6 (1'), 178,9 (1''), 210,0 (3).

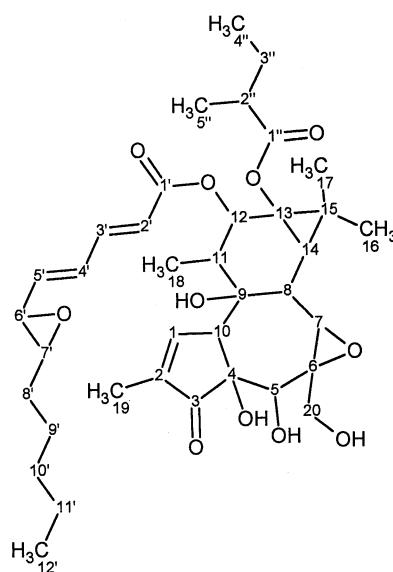
Hợp chất 25: 12-[(2Z,4E)-deca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylpropanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d), 0,86 (3H (10'), t), 1,16 (3H (4''), d), 1,19 (3H (3''), d, $J=7,0$ Hz), 1,22 (3H (16), s), 1,22 (3H (17), s), 1,25 (2H (8'), m), 1,27 (1H (14), d, $J=3,1$ Hz), 1,29 (2H (9'), m), 1,41 (2H (7'), br. s.), 1,75 (3H (19), s), 1,94 (1H (11), dd, $J=10,0, 6,4$ Hz), 2,16 (2H (6'), s), 2,58 (1H (2''), dt, $J=14,0, 7,0$ Hz), 3,16 (1H (8), d, $J=6,7$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,55 (1H (OH), br. s), 3,78 (1H (20), d, $J=12,5$ Hz), 3,86 (1H (20), d, $J=13,1$ Hz), 4,05 (1H (10), d, $J=5,4$ Hz), 4,21 (1H (5), s), 5,41 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,51 (1H (2'), d, $J=11,2$ Hz), 6,06 (1H (5'), dd, $J=15,3, 7,0$ Hz), 6,55 (1H (3'), t, $J=11,4$ Hz), 7,29 (1H (4'), dd, $J=15,3, 7,0$ Hz), 7,71 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 14,7 (10'), 15,1 (18), 17,1 (16), 18,6 (3''), 18,6 (4''), 22,5 (9'), 23,7 (17), 26,6 (15), 28,4 (7'), 31,4 (8'), 33,0 (6'), 34,2 (2''), 36,0 (14), 36,1 (8), 45,7 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,5 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 76,0 (12), 77,2 (9), 115,0 (2'), 126,9 (4'), 133,5 (2), 145,9 (3'), 146,2 (5'), 164,8 (1), 165,9 (1'), 179,3 (1''), 210,0 (3).

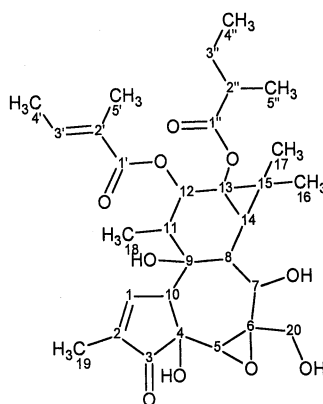
Hợp chất 26: 12-[(2E,4E)-6,7-(anti)-epoxy-dodeca-2,4-dienoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,87 (3H (18), d, $J=4,4$ Hz), 0,86 (3H (12'), br. s.), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,3$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,22 (3H (17), br. s.), 1,24 (3H (16), s), 1,27 (1H (14), d, $J=7,3$ Hz), 1,28 (2H (11'), m), 1,29 (2H (10'), m), 1,44 (2H (9'), m), 1,57 (2H (8'), m), 1,72 (2H (3''), dd, $J=13,9, 7,1$ Hz), 1,75 (3H (19), d, $J=1,5$ Hz), 1,95 (1H (11), m), 2,37 (1H (2''), m), 2,85 (1H (7'), tt, $J=5,6, 2,0$ Hz), 3,15 (1H (6'), d, $J=7,8$ Hz), 3,17 (1H (8), s), 3,28 (1H (7), s), 3,52 (1H (OH), d, $J=2,9$ Hz), 3,76 (1H (OH), m), 3,79 (1H (20), d, $J=2,9$ Hz), 3,87 (1H (20), m), 4,05 (1H (10), d, $J=2,0$ Hz), 4,22 (1H (5), d), 5,42 (1H (12), d, $J=10,3$ Hz), 5,83 (1H (5'), d, $J=15,2, 7,8$ Hz), 5,87 (1H (2'), d, $J=15,7$ Hz), 6,00 (1H (OH), m), 6,47 (1H (4'), dd, $J=14,7, 11,2$ Hz), 7,20 (1H (3'), dd, $J=15,2, 11,2$ Hz), 7,71 (1H (1), br. s.).

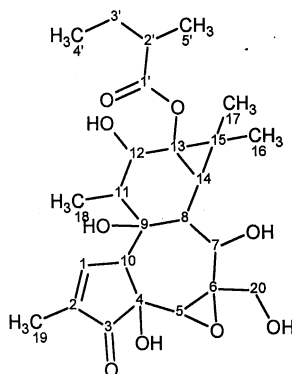
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,0 (12'), 15,1 (18), 16,2 (5''), 17,2 (16), 22,5 (11'), 23,7 (17), 25,5 (9'), 26,2 (3''), 26,8 (15), 31,5 (10'), 31,9 (8'), 36,1 (8), 36,2 (14), 41,2 (2''), 45,9 (11), 49,0 (10), 57,5 (6'), 61,6 (7'), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,4 (13), 71,7 (5), 72,3 (4), 77,1 (9), 77,1 (12), 121,6 (2'), 130,9 (4'), 133,5 (2), 139,7 (5'), 143,3 (3'), 164,7 (1), 166,2 (1'), 179,0 (1''), 210,1 (3).

Hợp chất 29: 12-tigloyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,83 (3H (18), d, $J=6,8$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,6$ Hz), 1,13 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,20 (1H (14), d, $J=5,9$ Hz), 1,22 (3H (17), s), 1,23 (3H (16), s), 1,45 (1H (3''), tt, $J=14,2, 7,3$ Hz), 1,72 (1H (3''), dd), 1,77 (3H (5'), dd, $J=7,1, 1,2$ Hz), 1,80 (3H (4'), d, $J=1,5$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,5$ Hz), 2,11 (1H (11), dq), 2,29 (1H (8), d, $J=5,4$ Hz), 2,38 (1H (2''), m, $J=7,0, 6,8$ Hz), 2,47 (1H (20-OH), t, $J=6,8$ Hz), 2,98 (1H (4-OH), s), 3,53 (1H (10), m), 3,73 (1H (5), d, $J=1,0$ Hz), 3,81 (1H (20), dd, $J=12,7, 6,8$ Hz), 3,92 (1H (20), m, $J=12,7, 6,8$ Hz), 4,46 (1H (7), d, $J=5,4$ Hz), 5,10 (1H (7-OH), d, $J=5,4$ Hz), 5,39 (1H (12), d, $J=10,3$ Hz), 6,55 (1H (9-OH), m), 6,80 (1H (3'), m, $J=7,1, 6,8, 1,5$ Hz), 7,58 (1H (1), s), ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 12,2 (4'), 14,0 (18), 14,4 (5'), 16,2 (5''), 17,0 (17), 23,5 (16), 26,2 (15), 26,2 (3''), 34,7 (14), 35,2 (8), 41,3 (2''), 43,7 (11), 57,3 (10), 62,6 (5), 64,2 (20), 67,0 (6), 67,0 (13), 71,3 (4), 75,8 (12), 77,3 (7), 79,1 (9), 128,3 (2'), 134,7 (2), 137,8 (3'), 159,7 (1), 167,4 (1'), 179,7 (1''), 205,7 (3).

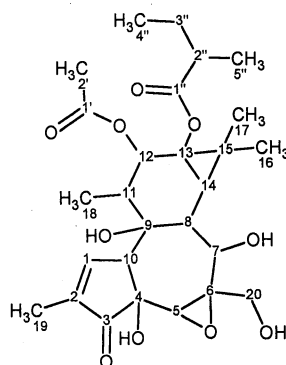
Hợp chất 30: 13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,91 (3H (4'), t, $J=7,6$ Hz), 1,02 (3H (18), d, $J=6,4$ Hz), 1,15 (1H (14), d, $J=5,9$ Hz), 1,15 (3H (5'), d, $J=7,3$ Hz), 1,19 (3H (16), s), 1,22 (3H (17), s), 1,46 (1H (3'), ddd, $J=14,1, 7,0, 6,8$ Hz), 1,70 (1H (3'), dt, $J=13,7, 7,3$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,5$ Hz), 1,93 (1H (11), dq, $J=9,8, 6,6, 6,5$ Hz), 2,24 (1H (8), d, $J=5,9$ Hz), 2,40 (1H (2'), m, $J=7,0, 6,8$ Hz), 2,84 (1H (20-OH), br, s), 3,44 (1H (4-OH), s), 3,50 (1H (10), t, $J=2,4$ Hz), 3,76 (1H (5), s), 3,84 (1H (20), dd, $J=12,2, 3,9$ Hz), 3,88 (1H (12), dd, $J=10,0, 3,7$ Hz), 3,92 (1H (20), d, $J=12,2, 5,9$ Hz), 4,46 (1H (7), d, $J=4,4$ Hz), 4,57 (1H (OH), m), 5,20 (1H (OH), m), 7,60 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,7 (4'), 14,6 (18), 16,5 (5'), 16,7 (16), 23,6 (17), 26,4 (15), 26,5 (3'), 33,8 (14), 35,5 (8), 41,1 (2'), 45,5 (11), 57,8 (10), 62,6 (5), 64,1 (20), 66,9 (6), 68,0 (13), 71,3 (4), 76,8 (12), 77,3 (7), 78,8 (9), 134,4 (2), 160,2 (1), 180,0 (1'), 206,2 (3).

Hợp chất 31: 12-axetyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on

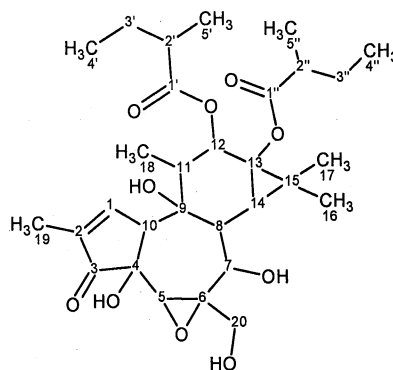


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,17 (3H (16), s), 1,18 (1H (14), s), 1,22 (3H (17), s), 1,44 (1H (3''), m, $J=14,1, 7,3, 7,1$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,2$ Hz), 2,04 (3H (2'), s), 2,09 (1H (11), dq, $J=10,2, 6,5$ Hz), 2,31 (1H (8), d, $J=5,6$ Hz), 2,37 (1H (2''), sxt, $J=7,0$ Hz), 2,88 (1H (20-OH), m), 3,52 (1H (10), d, $J=2,6$ Hz), 3,59 (1H (4-OH), s), 3,81 (1H (5), d, $J=0,9$ Hz), 3,83 (1H (20), d, $J=12,4$ Hz), 3,96 (1H (20), d), 4,39 (1H (7), d, $J=5,1$ Hz), 5,04 (1H (7-OH), d, $J=5,5$ Hz), 5,3 (1H (12), d, $J=10,1$ Hz), 6,48 (1H (9-OH), br, s), 7,58 (1H (1), s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 14,0 (18), 16,2 (5''), 16,7 (16), 20,9 (2'), 23,5 (17), 26,1 (3''), 26,2 (15), 34,6 (14), 35,1 (8), 41,3 (2''), 43,4 (11), 57,3 (10), 62,4 (5), 63,7 (20), 65,6 (13), 67,3 (6), 71,3 (4), 76,1 (12), 77,2 (7), 79,0 (9), 134,6 (2), 159,8 (1), 170,6 (1'), 179,7 (1''), 206,1 (3).

o

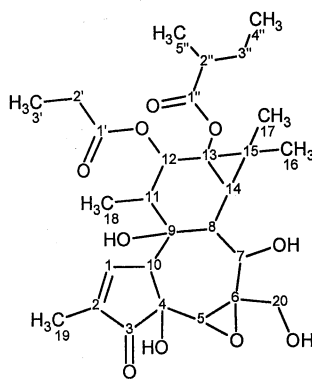
Hợp chất 32: 12,13-di-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,89 (3H (4'), m, $J=7,6$ Hz), 0,91 (3H (4''), d, $J=7,5$ Hz), 1,11 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,12 (3H (5'), d, $J=7,0$ Hz), 1,17 (3H (16), s), 1,18 (1H (14), d, $J=5,7$ Hz), 1,19 (3H (17), s), 1,42 (1H (3'), m), 1,46 (1H (3''), dt, $J=6,8, 3,3$ Hz), 1,62 (1H (3'), dt, $J=8,2, 6,9$ Hz), 1,68 (1H (3''), d, $J=7,1$ Hz), 1,80 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,3$ Hz), 2,10 (1H (11), dd, $J=10,2, 6, 6$ Hz), 2,33 (1H (8), d, $J=5,4$ Hz), 2,35 (1H (2'), m), 2,38 (1H (2''), d, $J=4,3$ Hz), 3,14 (1H (20-OH), br, s), 3,54 (1H (10), dd, $J=2,4, 2,2$ Hz), 3,83 (1H (20), d, $J=13,0$ Hz), 3,85 (1H (5), d, $J=1,0$ Hz), 3,96 (1H (4-OH), s), 3,98 (1H (20), m, $J=12,8$ Hz), 4,37 (1H (7), d, $J=5,3$ Hz), 5,03 (1H (7-OH), d, $J=5,5$ Hz), 5,36 (1H (12), d, $J=10,3$ Hz), 6,46 (1H (9-OH), s), 7,59 (1H (1) s).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 11,6 (4'), 13,9 (18), 16,1 (5''), 16,8 (5'), 16,9 (16), 23,5 (17), 26,0 (15), 26,2 (3''), 26,7 (3'), 34,6 (14), 35,1 (8), 41,3 (2''), 41,7 (2'), 43,3 (11), 57,2 (10), 62,2 (5), 63,2 (20), 65,6 (13), 67,6 (6), 71,3 (4), 75,4 (12), 77,2 (7), 79,1 (9), 134,6 (2), 160,0 (1), 175,9 (1'), 179,6 (1''), 206,3 (3).

Hợp chất 33: 12-propanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on

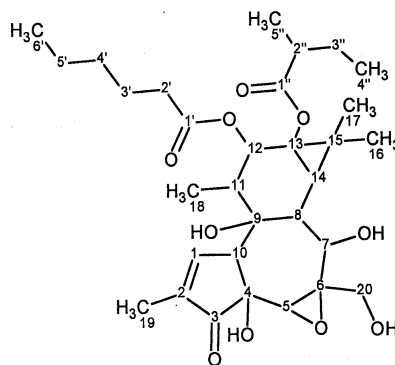


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,83 (3H (18), d), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,13 (3H (3'), t, $J=7,6$ Hz), 1,18 (3H (16), s), 1,19 (1H (14), s), 1,22 (3H (17), s), 1,44 (1H (3''), m, $J=14,1, 7,5, 7,1$ Hz), 1,71 (1H (3''), ddd, $J=13,9, 7,3, 7,1$ Hz), 1,81, (3H (19), dd, $J=2,8, 1,3$ Hz), 2,08 (1H (11), dd, $J=10,2,$

6,5 Hz), 2,29 (1H (8), m), 2,31 (2H (2'), m), 2,37 (1H (2''), d, J=7,0 Hz), 2,72 (1H (20-OH), t, J=6,7 Hz), 3,34 (1H (4-OH), s), 3,53 (1H (10), d, J=2,4 Hz), 3,78 (1H (5), d), 3,82 (1H (20), dd, J=12,7, 5,9 Hz), 3,94 (1H (20), dd, J=12,7, 5,9 Hz), 4,42 (1H (7), d, J=5,6 Hz), 5,06 (1H (7-OH), d, J=5,6 Hz), 5,32 (1H (12), d, J=10,3 Hz), 6,49 (1H (9-OH), s), 7,58 (1H (1), d, J=1,3 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,3 (3'), 10,3 (19), 11,6 (4''), 14,0 (18), 16,2 (5''), 16,8 (16), 23,5 (17), 26,1 (3''), 26,2 (15), 27,8 (2'), 34,6 (14), 35,1 (8), 41,3 (2''), 43,4 (11), 57,3 (10), 62,5 (5), 63,8 (20), 65,6 (13), 67,2 (6), 71,3 (4), 75,9 (12), 77,3 (7), 79,1 (9), 134,6 (2), 159,8 (1), 173,9 (1'), 179,7 (1''), 206,0 (3).

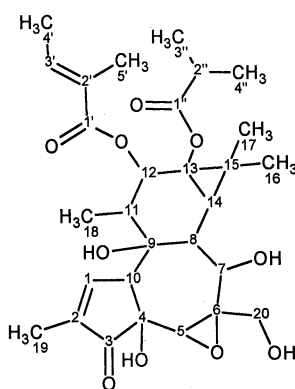
Hợp chất 34: 12-hexanoyl-13-(2-methylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglicien-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,83 (3H (18), d), 0,88 (3H (6'), t, J=6,9 Hz), 0,92 (3H (4''), t, J=7,5 Hz), 1,12 (3H (5''), d, J=7,1 Hz), 1,18 (3H (16), s), 1,19 (1H (14), s), 1,21 (3H (17), s), 1,29 (2H (4'), m), 1,30 (2H (5'), m, J=7,6, 7,3, 3,6 Hz), 1,44 (1H, (3''), dt, J=14,1, 7,0 Hz), 1,61 (2H (3'), m), 1,70 (1H (3''), m, J=14,1, 7,3, 7,1 Hz), 1,81 (3H (19), dd, J=2,8, 1,3 Hz), 2,08 (1H (11), dq, J=10,3, 6,5 Hz), 2,3 (1H (8), d, J=3,8 Hz), 2,28 (2H (2'), m), 2,37 (1H (2''), q, J=7,0 Hz), 2,73 (1H (20-OH), m), 3,35 (1H (4-OH), br, s), 3,53 (1H (10), t, J=2,5 Hz), 3,78 (1H (5), d, J=1,1 Hz), 3,82 (1H (20), d, J=12,6 Hz), 3,94 (1H (20), d, J=12,5 Hz), 4,42 (1H (7), d, J=3,9 Hz), 5,06 (1H (7-OH), d, J=5,4 Hz), 5,34 (1H (12), d, J=10,3 Hz), 6,48 (1H (9-OH), s), 7,58 (1H (1), d, J=1,5 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 13,9 (18), 13,9 (6'), 16,1 (5''), 16,8 (16), 22,3 (5'), 23,5 (17), 24,9 (3'), 26,1 (15), 26,2 (3''), 31,1 (4'), 34,5 (2'), 34,6 (14), 35,2 (8), 41,3 (2''), 43,3 (11), 57,3 (10), 62,5 (5), 64,0 (20), 65,6 (13), 67,1 (6), 71,3 (4), 75,6 (12), 77,2 (7), 79,1 (9), 134,6 (2), 159,8 (1), 173,3 (1'), 179,6 (1''), 206,0 (3).

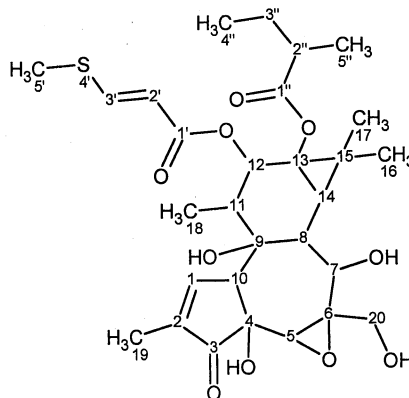
Hợp chất 35: 12-tigloyl-13-(2-metylpropanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d), 1,15 (3H (3''), d, $J=7,0$ Hz), 1,17 (3H (4''), d, $J=7,0$ Hz), 1,21 (1H (14), m), 1,21 (3H (16), s), 1,21 (3H (17), s), 1,77 (3H (4'), dd, $J=7,1$, 1,1 Hz), 1,80 (3H (5'), d, $J=1,3$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,9$, 1,4 Hz), 2,13 (1H (11), dd, $J=9,6$, 6,3 Hz), 2,32 (1H (8), d, $J=6,1$ Hz), 2,58 (1H (2''), spt, $J=7,0$ Hz), 3,46 (1H (4-OH), s), 3,54 (1H (10), d, $J=2,5$ Hz), 3,81 (1H (5), d, $J=1,2$ Hz), 3,82 (1H (20), m), 3,96 (1H (20), d, $J=13,0$ Hz), 4,42 (1H (7), d, $J=4,9$ Hz), 5,07 (1H (7-OH), d, $J=5,5$ Hz), 5,37 (1H (12), d, $J=10,2$ Hz), 6,52 (1H (9-OH), s), 6,80 (1H (3'), dq, $J=7,0$, 1,4 Hz), 7,58 (1H (1), dd, $J=2,0$, 1,4 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 12,2 (5'), 14,0 (18), 14,4 (4'), 16,9 (16), 18,5 (3''), 18,6 (4''), 23,5 (17), 26,0 (15), 34,2 (2''), 34,6 (14), 35,2 (8), 43,6 (11), 57,3 (10), 62,4 (5), 63,7 (20), 65,7 (13), 67,3 (6), 71,3 (4), 75,7 (12), 77,2 (7), 79,1 (9), 128,3 (2'), 134,6 (2), 137,8 (3'), 159,9 (1), 167,5 (1'), 180,1 (1''), 206,0 (3).

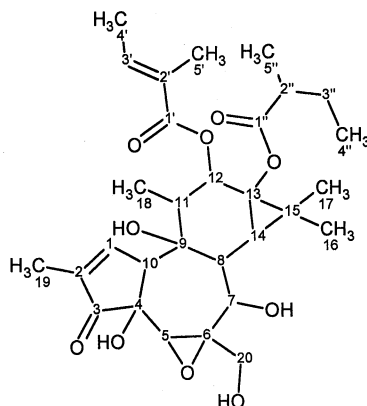
Hợp chất 36: 12-[(2E)-3-methylthioprop-2-enoyl]-13-(2-methylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,92 (3H (4''), t, $J=7,0$ Hz), 0,84 (3H (18), d, $J=6,5$ Hz), 1,13 (3H (5'') d, $J=7,0$ Hz), 1,18 (1H (14), s), 1,20 (3H (16), s), 1,22 (3H (17), s), 1,44 (1H (3''), dt, $J=13,9, 7,0$ Hz), 1,72 (1H (3''), d, $J=13,8$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,7, 1,2$ Hz), 2,12 (1H (11), dd, $J=9,4, 5,6$ Hz), 2,31 (1H (8), d, $J=6,0$ Hz), 2,32 (3H (5'), s), 2,38 (1H (2''), q, $J=7,0$ Hz), 3,36 (1H (4-OH), s), 3,53 (1H (10), d, $J=2,3$ Hz), 3,78 (1H (5), d, $J=0,9$ Hz), 3,82 (1H (20), d, $J=12,6$ Hz), 3,94 (1H (20), d), 4,43 (1H (7), d, $J=4,6$ Hz), 5,08 (1H (7-OH), d), 5,37 (1H (12), d, $J=10,2$ Hz), 5,61 (1H (2'), d, $J=14,9$ Hz), 6,53 (1H (9-OH), s), 7,58 (1H (1), d, $J=1,9$ Hz), 7,68 (1H (3'), d, $J=14,9$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 14,0 (18), 14,3 (5'), 16,2 (5''), 16,9 (16), 23,5 (17), 26,2 (15), 26,2 (3''), 34,7 (14), 35,2 (8), 41,3 (2''), 43,6 (11), 57,3 (10), 62,5 (5), 64,0 (20), 65,6 (13), 67,1 (6), 71,3 (4), 75,8 (12), 77,3 (7), 79,1 (9), 112,7 (2'), 134,6 (2), 147,7 (3'), 159,8 (1), 164,5 (1'), 179,8 (1''), 206,0 (3).

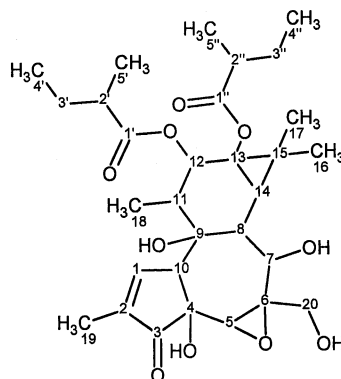
Hợp chất 37: 12-tigloyl-13-(2-methylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (2H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=6,9$ Hz), 1,19 (1H (14), s), 1,20 (1H (16), s), 1,21 (1H (17), s), 1,44 (1H (3''), dt, $J=14,1, 7,0$ Hz), 1,72 (1H (3''), dq), 1,77 (3H (4'), dd, $J=7,1, 1,1$ Hz), 1,8 (3H (5'), t, $J=1,3$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,5$ Hz), 2,13 (1H (11), q, $J=2,9$ Hz), 2,33 (1H (8), d, $J=5,7$ Hz), 2,38 (1H (2''), q, $J=7,0$ Hz), 2,99 (1H (20-OH), br, s,), 3,55 (1H (10), t, $J=2,6$ Hz), 3,70 (1H (4-OH), br, s,), 3,83 (1H (20), dd, $J=12,8, 4,9$ Hz), 3,84 (1H (5), d, $J=1,1$ Hz), 3,98 (1H (20), dd, $J=12,8, 7,3$ Hz), 4,39 (1H (7), d, $J=5,5$ Hz), 5,06 (1H (7-OH), d, $J=5,5$ Hz), 5,39 (1H (12), d, $J=10,2$ Hz), 6,53 (1H (9-OH), br, s,), 6,8 (1H (3'), dd, $J=7,1, 1,5$ Hz), 7,59 (1H (1), dd, $J=2,0, 1,5$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 12,2 (5'), 14,0 (18), 14,4 (4'), 16,2 (5''), 17,0 (16), 23,5 (17), 26,1 (15), 26,1 (3''), 34,7 (14), 35,2 (8), 41,2 (2''), 43,7 (11), 57,2 (10), 62,3 (5), 63,5 (20), 65,7 (13), 67,5 (6), 71,3 (4), 75,9 (12), 77,2 (7), 79,1 (9), 128,3 (2'), 134,6 (2), 137,7 (3'), 159,9 (1), 167,4 (1'), 179,7 (1''), 206,1 (3).

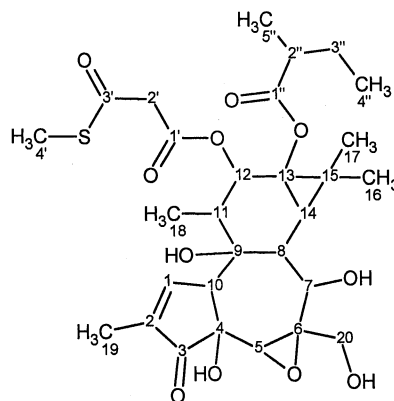
Hợp chất 38: 12,13-di-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,89 (3H (4'), t, $J=7,4$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,12 (3H (5'), d, $J=7,0$ Hz), 1,12 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,19 (1H (14), d, $J=1,5$ Hz), 1,20 (3H (16) s), 1,21 (3H (17), s), 1,45 (1H (3'), dd, $J=14,1, 6,8$ Hz), 1,45 (1H (3''), dd, $J=14,1, 6,8$ Hz), 1,62 (1H (3'), dd, $J=8,3, 7,5$ Hz), 1,68 (1H (3''), dd, $J=14,1, 6,9$ Hz), 1,81 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,3$ Hz), 2,08 (1H (11), dd, $J=10,3, 6,5$ Hz), 2,30 (1H (8), d, $J=5,5$ Hz), 2,36 (1H (2'), m), 2,36 (1H (2''), m), 2,62 (1H (10-OH), t, $J=6,8$ Hz), 3,22 (1H (4-OH), s), 3,53 (1H (10), br, s), 3,76 (1H (5), d, $J=1,1$ Hz), 3,82 (1H (20), dd, $J=12,5, 6,3$ Hz), 3,93 (1H (20), dd, $J=12,6, 7,0$ Hz), 4,44 (1H (7), d, $J=5,5$ Hz), 5,06 (1H (7-OH), d, $J=5,6$ Hz), 5,36 (1H (12), d, $J=10,3$ Hz), 6,48 (1H (9-OH), s), 7,58 (1H (1), d, $J=2,0$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4'), 11,6 (4''), 13,9 (18), 16,1 (5''), 16,9 (5'), 17,0 (16), 23,5 (17), 26,0 (15), 26,2 (3''), 26,7 (3'), 34,6 (14), 35,2 (8), 41,3 (2'), 41,8 (2''), 43,3 (11), 57,3 (10), 62,5 (5), 63,9 (20), 65,6 (13), 67,2 (6), 71,3 (4), 75,4 (12), 77,3 (7), 79,1 (9), 134,7 (2), 159,8 (1), 175,9 (1'), 179,6 (1''), 205,9 (3).

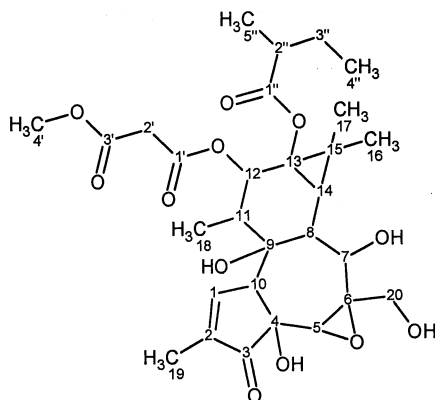
Hợp chất 39: 12-{[2-(metylsulfanyl)cacbonyl]-axetoyl}-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,87 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,5$ Hz), 1,13 (3H (5''), d, $J=7,0$ Hz), 1,16 (3H (16), s), 1,20 (1H (14), d, $J=5,9$ Hz), 1,23 (17), br, s), 1,45 (1H (3''), td, $J=14,1, 7,2$ Hz), 1,70 (1H (3''), td, $J=14,0, 7,2$ Hz), 1,82 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,3$ Hz), 2,05 (1H (OH), d, $J=3,40$ Hz), 2,09 (1H (11), dd, $J=10,3, 6,5$ Hz), 2,27 (1H (8), d, $J=5,9$ Hz), 2,34 (3H (4'), s), 2,38 (1H (2''), t, $J=7,0$ Hz), 2,85 (1H (4-OH), s), 3,52 (1H (10), dd, $J=2,6, 2,3$ Hz), 3,57 (2H (2'), d, $J=4,5$ Hz), 3,70 (1H (5), d, $J=1,1$ Hz), 3,81 (1H (20), dd, $J=12,2, 6,2$ Hz), 3,89 (1H (20), m), 4,46 (1H (7), d, $J=5,7$ Hz), 5,02 (1H (7-OH), d, $J=5,9$ Hz), 5,35 (1H (12), d, $J=10,3$ Hz), 6,47 (1H (9-OH), m), 7,56 (1H (1), dd, $J=2,0, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 12,1 (4'), 14,0 (18), 16,2 (5''), 16,6 (16), 23,5 (17), 26,2 (3''), 26,5 (15), 34,8 (14), 35,2 (8), 41,3 (2''), 43,3 (11), 49,5 (2'), 57,4 (10), 62,7 (5), 64,4 (20), 65,3 (13), 66,8 (6), 71,3 (4), 77,2 (7), 77,9 (12), 79,1 (9), 134,7 (2), 159,5 (1), 165,7 (1'), 179,8 (1''), 190,9 (3'), 205,6 (3).

Hợp chất 40: 12-[(2-metoxycarbonyl)-axetoyl]-13-(2-metylbutanoyl)-5,6-epoxy-4,7,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,88 (3H (18), d), 0,92 (3H (4''), t, $J=7,6$ Hz), 1,13 (3H (5''), d, $J=6,8$ Hz), 1,17 (3H (16), s), 1,21 (1H (14), d, $J=5,9$ Hz), 1,23 (3H (17), s), 1,45 (1H (3''), dt, $J=14,2, 6,8$ Hz), 1,70 (1H (3''), dd, $J=14,2, 6,8$ Hz), 1,82 (3H (19), dd, $J=2,7, 1,2$ Hz), 2,09 (1H (11), dd, $J=10,3, 6,4$ Hz), 2,27 (1H (8), d, $J=4,9$ Hz), 2,38 (1H (2''), m, $J=14,1, 7,0, 6,8$ Hz), 2,72 (1H (4-OH), s), 3,37 (2H (2'), s), 3,53 (1H (10), d, $J=2,4$ Hz), 3,70 (1H (5), d, $J=1,0$ Hz), 3,72 (3H (4'), s), 3,80 (1H (20), m), 3,90 (1H (20), m), 4,46 (1H (7), d, $J=2,4$ Hz), 5,02 (1H (7-OH), d, $J=5,9$ Hz), 6,49 (1H (9-OH), s), 7,56 (1H (1), d, $J=2,0$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10,3 (19), 11,6 (4''), 13,9 (18), 16,2 (5''), 16,7 (16), 23,5 (17), 26,2 (3''), 26,5 (15), 34,8 (14), 35,2 (8), 41,3 (2''), 41,4 (2'), 43,3 (11), 52,5 (4'), 57,4 (10), 62,7 (5), 64,7 (20), 65,3 (13), 66,6 (6), 71,3 (4), 77,2 (7), 77,7 (12), 79,1 (9), 134,8 (2), 159,4 (1), 166,1 (1'), 166,1 (3'), 179,8 (1''), 205,5 (3).

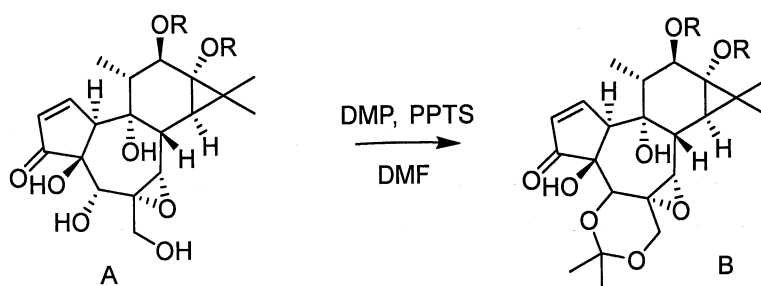
Ví dụ 3: Điều chế các dẫn xuất Tiglian

Nhiều hợp chất được điều chế bán tổng hợp bằng sự thủy phân các este C-12 và C-13 trong hỗn hợp chứa 5,20-axetonit của các hợp chất tiglian như hợp chất 1 và các hợp chất có liên quan, sau đó bằng sự tái este hóa ở C-12 và C-13 bằng các chất phản ứng tiêu chuẩn bằng cách sử dụng các phương pháp dưới đây.

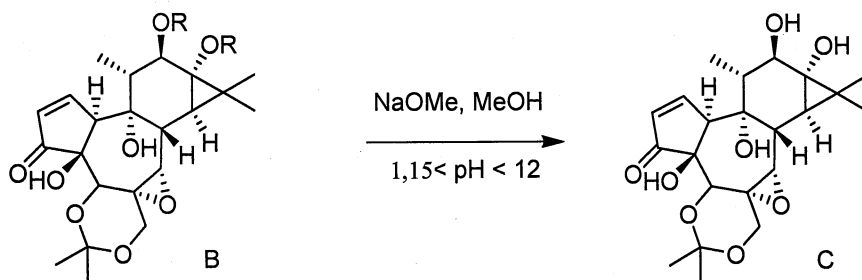
Hỗn hợp thô chứa các este tiglian để tổng hợp các chất tương tự tiglian được điều chế bằng cách nghiền thành bột thô 150 g hạt *Fontainea picrosperma* tiếp đó được chiết bằng cách khuấy với axeton trong bình tam giác 1L. Sau thời gian 4 giờ,

hỗn dịch này được lọc chân không, và bánh lọc được rửa bằng axeton cho đến khi TLC (PE:EtOAc : 4:6) thể hiện sự có mặt của este tiglian. Phần lọc đã thu gom được làm bay hơi, tạo ra hỗn hợp thô chứa este. Chất béo tiếp đó được loại bỏ bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực thấp trên silicagel (ete dầu mỏ/etyl axetat; PE/EtOAc 8:2→4:6 làm dung môi rửa giải) để tạo ra 8,2 g (5,5%) hỗn hợp este thô.

Hỗn hợp chứa este tiếp đó được bảo vệ, được khử este hóa và được tái este hóa tại vị trí C-12 và C-13 như được minh họa trong các phản ứng sau đây bằng cách sử dụng các nhóm axyl biến đổi để tạo ra các hợp chất 21, 22, 23, 27, 28, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 và 60.



Dung dịch 10 mL chứa hỗn hợp este A trong dimetylformamit (DMF) được bổ sung vào dung dịch 50 mL chứa pyridin-p-toluensulfonat (PPTS, 4,1 g, lượng dư) trong DMF (10 mL) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút. 120 mL 2,2-dimetoxipropan (DMP) tiếp đó được bổ sung vào và dung dịch được khuấy trong thời gian 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch NaCl (150 mL) và được rửa bằng etyl axetat (EtOAc, 50 mL). Pha hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaCl, được sấy khô (Na_2SO_4), được lọc và làm bay hơi. Cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 8:2→6:4 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 5,2 g (3,5%) hỗn hợp este 5,20-axetonit B. Nguyên liệu không phản ứng được phản ứng lại dưới cùng điều kiện để tạo ra hỗn hợp este bổ sung B.

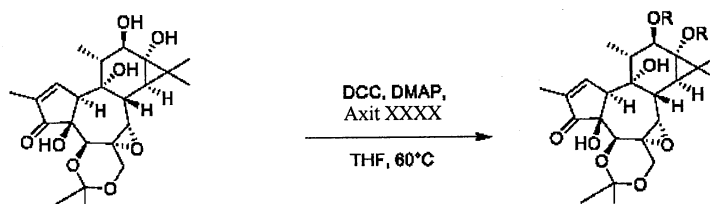


Dung dịch 0,21N NaOMe được điều chế mới bằng cách bổ sung từ từ các mẫu nhỏ natri (9,7 g) vào dung dịch metanol được khuấy (mức HPLC, 2 L). Trong điều kiện khuấy mạnh, 128 mL dung dịch này tiếp đó được bổ sung nhanh vào 6,4 g hỗn hợp este 5,20-axetonit B. Độ pH của dung dịch tạo thành phải được duy trì trong khoảng từ 11,5 đến 12,0 bằng cách bổ sung chính xác 0,21 M NaOMe, cẩn thận để không vượt quá độ pH=12,5. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 24 giờ, hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng axit axetic, được lọc và làm bay hơi đến khoảng 1/20 thể tích ban đầu. EtOAc (20 mL) được bổ sung vào và dung dịch được rửa bằng 2N H₂SO₄ (100 mL). Dung dịch rửa axit được chiết ngược bằng EtOAc, và dung dịch EtOAc đã thu gom được rửa bằng dung dịch NaCl (2 x 300 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 6:4→4:6 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 1,4 g bột màu trắng.

Tổng hợp các chất tương tự tiglian bằng mẫu este hóa đối xứng; Các phương pháp nêu làm ví dụ

Phương pháp este hóa Steglich được cải biến

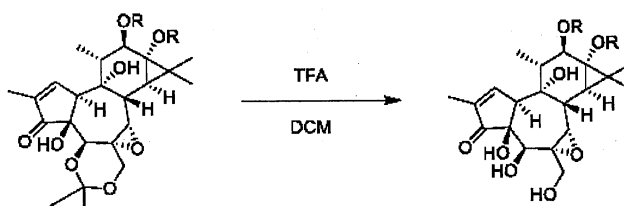
1.



Hợp chất 4-dimethylaminopyridin (DMAP) (15 mg; 0,12 mMol) được bổ sung vào dung dịch chứa deaxyl-tiglian axetonit (100 mg; 0,23 mMol) trong THF (5

mL) và dung dịch này được gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C (nhiệt độ bể dầu). Một cách riêng rẽ, hợp chất N,N'-dixyclohexylcarbodiimide (DCC, 10 Eq) được bổ sung vào dung dịch chứa axit carboxylic este hóa (10 Eq) trong THF (10 mL/g); sau khi khuấy trong khoảng thời gian 15 phút, hỗn dịch được lọc qua đệm chèn bông, và bổ sung từng giọt nhỏ vào dung dịch THF chứa deaxyl-tiglian axetonit. Sau khi khuấy trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc (≈ 200 mL) và rửa bằng 2N H₂SO₄ (≈ 50 mL), nước muối (2 x ≈ 50 mL), và tiếp theo với NaHCO₃ bão hòa (≈ 50 mL) và nước muối (2 x ≈ 50 mL). Sau khi làm khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1 $\rightarrow$ 6:4 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 111 mg (80%) bột màu trắng.

3.2 Phản ứng khử bảo vệ



Phương pháp A (TFA trong CH₂Cl₂)

Axetonit dieste (100 mg) được bổ sung vào dung dịch được điều chế mới chứa axit trifloaxetic (TFA) trong CH₂Cl₂ (2% thể tích/thể tích; 200 μ L, 2 μ L/mg). Sau khi khuấy trong thời gian từ 6 đến 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách rửa bằng hỗn hợp chứa NaHCO₃ bão hòa (≈ 10 mL) và nước muối (≈ 40 mL), và tiếp theo với chỉ riêng nước muối (2x ≈ 40 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 8:2 $\rightarrow$ 2:8 là dung dịch rửa giải) để tạo ra chất tương tự tiglian (hiệu suất khoảng: 60-70%).

Phương pháp B (HClO₄ trong MeOH)

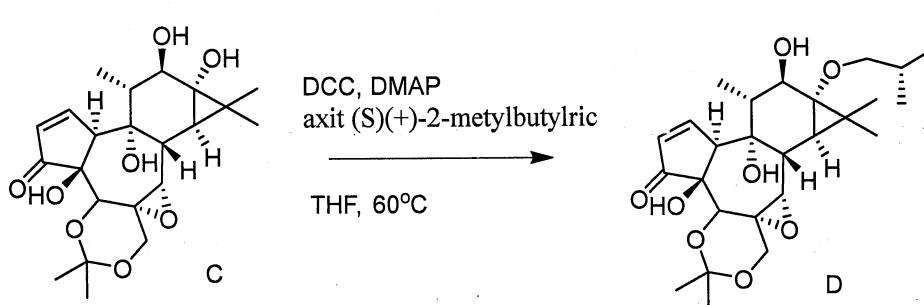
Axetonit dieste (100 mg) được bổ sung vào dung dịch được điều chế mới chứa HClO₄ trong MeOH [độ pH: khoảng từ 1,5 đến 2,0]. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong

phòng trong thời gian từ 6 đến 24 giờ, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách trung hòa với natri axetat, lọc và làm bay hơi đến khoảng 1/20 thể tích ban đầu. EtOAc (10 mL) tiếp đó được bổ sung vào, và dung dịch được rửa bằng 2N H₂SO₄ (30 mL) và tiếp đó với nước muối (30 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc - →4:6 là dung dịch rửa giải) để tạo ra dieste với hiệu suất nằm trong khoảng từ 60 đến 70%.

Phương pháp này được sử dụng để tạo ra các hợp chất 27, 41, 42, 43, 44, 46, 49 và 60.

Tổng hợp các dieste không đối xứng, các phương pháp được nêu làm ví dụ:

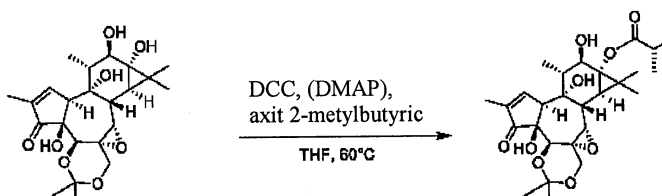
1.



Bổ sung 740 mL triethylamin (TEA) 34 mMol vào dung dịch chứa 12,13-deaxyl-5,20-axetonit (C) (1,4 g; 3,4 mMol) trong 10 mL tetrahydrofuran (THF), và dung dịch được gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C. Một cách riêng rẽ, N,N'-dixyclohexylcarbodiimide (DCC, 7,015 g; 34 mMol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit (S)-(+)-2-metylbutyric (3,702 mL; 34 mMol) trong THF (20 mL). Sau khi khuấy trong thời gian khoảng 15 phút, hỗn dịch được lọc và được bổ sung vào dung dịch được làm ấm chứa diol (C) ban đầu. Sau khi khuấy trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được pha loãng với EtOAc (≈200 mL) và được rửa bằng 2N H₂SO₄ (≈50 mL), dung dịch NaCl (2 x ≈50 mL), và tiếp đó với dung dịch NaHCO₃ (≈50 mL) và dung dịch NaCl (2 x ≈50 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên

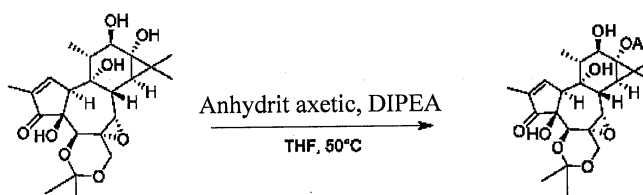
silicagel (PE/EtOAc 9:1→6:4 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-deaxyl-5,20-axetonit-13-[(S)-(+)-2-metylbutyrat (D) ở dạng bột màu trắng.

2.



Axit (S)-(+)-2-metylbutyric (109 μL ; 1,00 mMol) và N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (DCC, 206,33 mg; 1,00 mMol) được bổ sung vào dung dịch chứa 12,13-deaxyl-5,20-axetonit C (100 mg; 0,25 mMol) trong THF (5 mL). Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ 60°C (nhiệt độ bể dầu) trong thời gian 24 giờ, và tiếp đó được xử lý trung gian bằng cách pha loãng với EtOAc (≈ 20 mL) và rửa bằng 2N H₂SO₄ (≈ 50 mL), nước muối (2 x ≈ 50 mL), NaHCO₃ bão hòa (≈ 50 mL), và nước muối (2 x ≈ 50 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1→6:4 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 106,2 mg (60%) 12-deaxyl-5,20-axetonit-13-((S)-2-metylbutyrat) D ở dạng bột màu trắng.

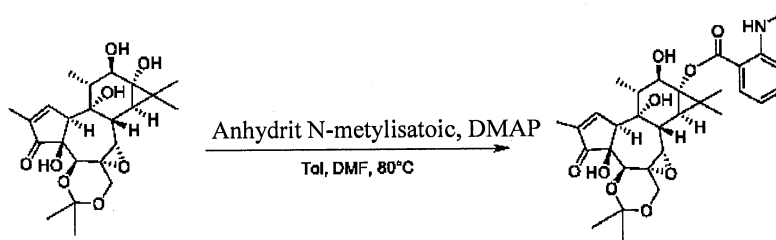
3.



Diisopropyletylamin (DIPEA) (131 μL ; 0,75 mMol) và anhydrit axetic (94 μL ; 0,75 mMol) được bổ sung vào dung dịch chứa 12,13-deaxyl-5,20-axetonit C (100 mg; 0,25 mMol) trong THF (5 mL). Sau khi khuấy trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ trong phòng, EtOAc (10 mL) được bổ sung vào, và dung dịch được rửa bằng 2N H₂SO₄ (2 x 20 mL) và nước muối (20 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm

bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc - $\rightarrow$ 4:6 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-deaxyl-13-axetyl-5,20-axetonit 104 mg (87%) có dạng bột màu trắng.

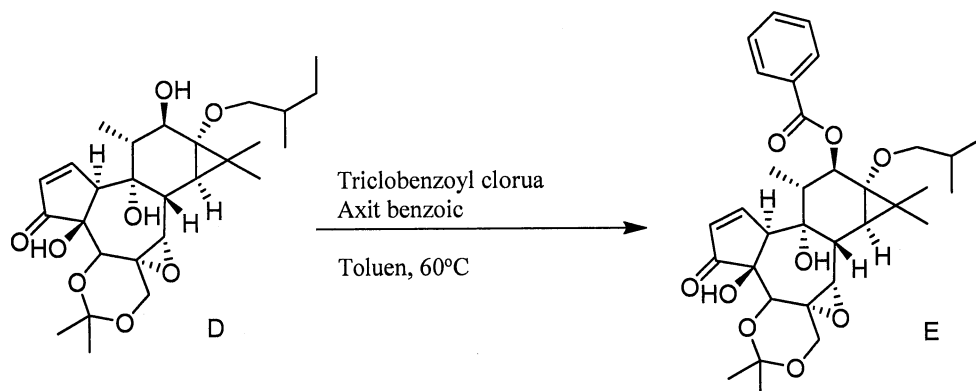
4.



Bổ sung anhydrit N-metylisatoic (266 mg; 1,50 mMol) và dimethylaminopyridin (DMAP) (31 mg; 0,25 mMol) vào dung dịch chứa deaxyl-5,20-axetonit (100 mg; 0,25 mMol) trong toluen (5 mL)/dimetylformamit (2mL). Sau khi khuấy trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 80°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc ($\approx$ 10 mL) và lần lượt rửa bằng [2N H₂SO₄ ($\approx$ 20 mL) + nước muối ($\approx$ 60 mL)] (2 lần), và [NaHCO₃ bão hòa ($\approx$ 20 mL) + nước muối ($\approx$ 60 mL)] (2 lần). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1 $\rightarrow$ 7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-deaxyl-13-[(N-metyl)-antranilat-5,20-axetonit, 114 mg (80%) có dạng bột màu trắng.

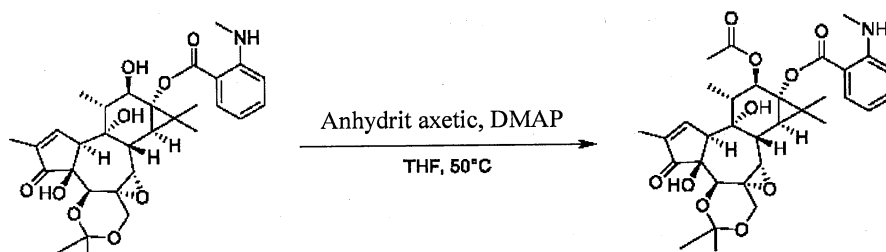
Phản ứng axyl hóa 13-monoeste: Phương pháp được nêu làm ví dụ

1.



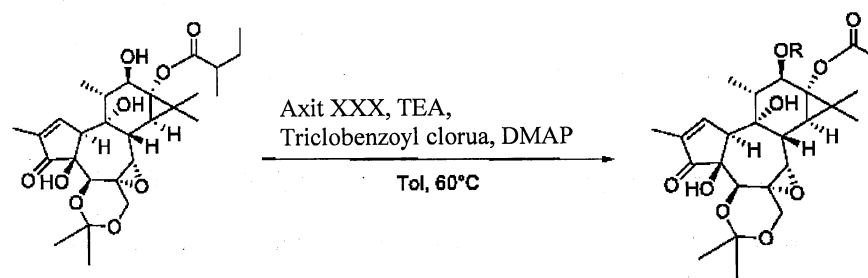
Bổ sung dimethylaminopyridin (DMAP) (249 mg; 2,04 mMol) vào dung dịch chứa 12-deaxyl-5,20-axetonit-13-[(S)-(+)-2-metylbutyrat (D) (1062 mg; 2,04 mMol) trong toluen (10 mL). Một cách riêng biệt, trietylamin (1,397 mL; 10,02 mMol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit benzoic 1224 mg; 10,02 mMol) trong toluen (20 mL) và dung dịch được khuấy trong thời gian khoảng 2 phút để hòa tan hoàn toàn; 2,4,6-triclobenzoyl clorua (1,566 mL; 10,02 mMol) tiếp đó được bổ sung vào (Dung dịch 1). Sau khi khuấy chế phẩm chứa hợp chất D trong thời gian 6 giờ, hỗn dịch được lọc và được đổ vào dung dịch 1. Sau khi khuấy trong thời gian từ 24 đến 48 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được pha loãng với EtOAc (≈ 10 mL) và được rửa bằng dung dịch NH_2SO_4 (≈ 40 mL), dung dịch NaCl (2 x ≈ 40 mL), và tiếp đó với dung dịch NaHCO_3 (≈ 40 mL) và dung dịch NaCl (2 x ≈ 40 mL). Sau khi sấy khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1 $\rightarrow$ 7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 5,20-axetonit-12-benzoat-13-[(S)-(+)-2-metylbutyrat E có dạng bột màu trắng.

2.



Anhydrit axetic (51 mg; 0,54 mMol) và dimetylaminopyridin (DMAP) (2,2 mg; 0,018 mMol) được bổ sung tuần tự vào dung dịch chứa deaxyl-13-(N-methylantranoyl)-5,20-axetonit (100 mg; 0,18 mMol) trong tetrahydrofuran (THF, 5 mL). Sau khi khuấy trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 50°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc (khoảng 10 mL) và rửa tuần tự bằng 2N H₂SO₄ (2 lần khoảng 40 mL), NaHCO₃ bão hòa (2 lần khoảng 40 mL), và nước muối (2 lần khoảng 40 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 95:05→7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-axetyl-13-(N-metyl)antranilat-5,20-axetonit, 105 mg (95%) có dạng bột màu trắng.

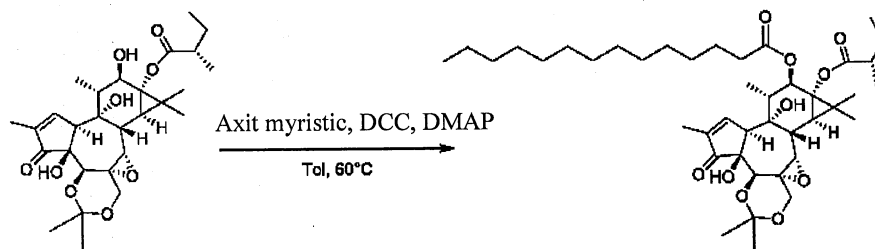
3.



Bổ sung dimetylaminopyridin (DMAP) (23 mg; 0,19 mMol) vào dung dịch chứa 12-deaxyl-5,20-axetonit-13-[(S)-2-metylbutyrat] (100 mg; 0,19 mMol) trong toluen (5 mL). Một cách riêng biệt, bổ sung trietylamin (132 μ L; 0,95 mMol) vào dung dịch chứa axit tiglic (95 mg; 0,95 mMol) trong toluen (5 mL), và dung dịch được khuấy trong thời gian khoảng 2 phút để hòa tan hoàn toàn; 2,4,6-triclobenzoyl clorua (148 μ L; 0,95 mMol) tiếp đó được bổ sung vào, và, sau khi khuấy trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng, hỗn dịch được lọc (bông gòn) và được bổ sung từng giọt vào dung dịch chứa diterpenoit monoeste trong toluen. Sau khi khuấy trong thời gian từ 24 đến 48 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc (khoảng 10 mL) và rửa bằng 2N H₂SO₄ (khoảng 40 mL), nước muối (2 x $\approx$ 40 mL), và tiếp theo với NaHCO₃ (khoảng 40 mL) và nước muối (2 x $\approx$ 40 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng

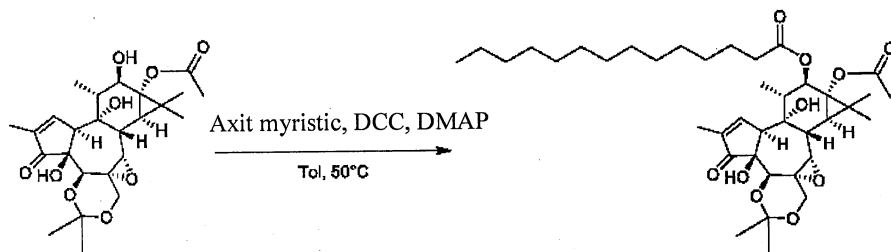
phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1→7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-tigloyl-13-metylbutyryl-5,20-axetonit, 59 mg (50%) có dạng bột màu trắng.

4.



Dung dịch chứa 12-deaxyl-5,20-axetonit-13-(S)-2-metylbutyrat (100 mg; 0,19 mMol) trong toluen (10 mL) được gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C, và axit myristic (217 mg; 0,95 mMol), N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (DCC) (196 mg; 0,95 mMol) và dimetylaminopyridin (DMAP) (23 mg; 0,19 mMol) được bổ sung tuần tự vào. Sau khi khuấy trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc (≈ 10 mL) và rửa bằng 2N H₂SO₄ (2x ≈ 40 mL), NaHCO₃ bão hòa (2x ≈ 40 mL), và nước muối (2x ≈ 40 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1→7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-myristoyl-13-(2-metylbutanoyl)-5,20-axetonit, 121 mg (70%) có dạng bột màu trắng.

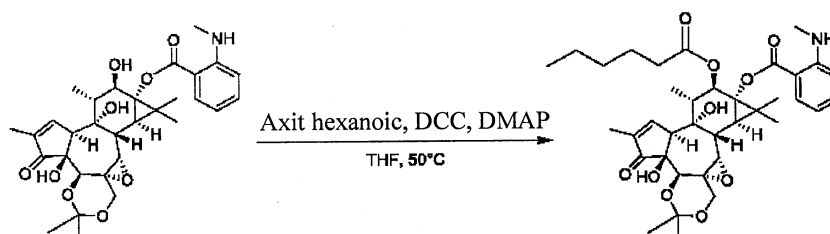
5.



Dung dịch chứa 12-deaxyl-5,20-axetonit-13-axetat (100 mg; 0,25 mMol) trong toluen (10 mL) được gia nhiệt đến nhiệt độ 60°C (nhiệt độ bể dầu), và axit myristic (286 mg; 1,00 mMol), N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (DCC) (206 mg; 1,00 mMol) và dimetylaminopyridin (DMAP) (31 mg; 0,25 mMol) tiếp đó được bổ sung vào.

Sau khi khuấy trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc (khoảng 10 mL) và rửa bằng 2N H₂SO₄ (2 lần khoảng 40 mL), NaHCO₃ bão hòa (2 lần khoảng 40 mL), và nước muối (2 lần khoảng 40 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1→7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-myristyl-13-axetyl-5,20-axetonit, 121 mg (70%) có dạng bột màu trắng.

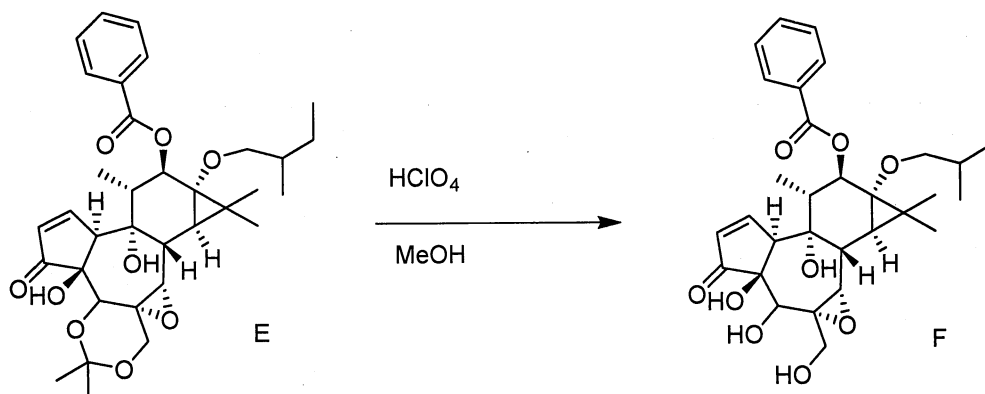
6.



Bổ sung tuần tự axit hexanoic (84 mg; 0,72 mMol), dixyclohexylcarbodiimide (DCC, 149 mg; 0,72 mMol), và dimetylamino pyridin (DMAP 22 mg; 0,18 mMol) vào dung dịch được gia nhiệt (60°C, nhiệt độ bể dầu) chứa deaxyl-13-(N-metylantranoyl)-5,20-axetonit (100 mg; 0,18 mMol) trong toluen (10 mL). Sau khi khuấy trong thời gian 12 giờ ở nhiệt độ 60°C, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách pha loãng với EtOAc (khoảng 10 mL) và rửa tuần tự bằng 2N H₂SO₄ (2 lần khoảng 40 mL), NaHCO₃ bão hòa (2 lần khoảng 40 mL), và nước muối (2 lần khoảng 40 mL). Sau khi sấy khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 9:1→7:3 là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-hexanoyl-13-(N-metylantranoyl)-5,20-axetonit, 108 mg (90%) có dạng bột màu trắng.

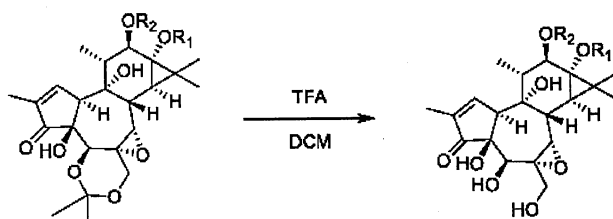
Phản ứng khử bảo vệ

1.



Bổ sung 5,20-axetonit-12-benzoat-13-[(S)-(+)-2-metylbutyrat E (637 mg; 1,02 mMol) vào dung dịch được điều chế mới chứa HClO_4 trong MeOH [$1,5 < \text{pH} < 2,0$]. Sau khi khuấy trong thời gian từ 6 đến 24 giờ, hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng natri axetat, được lọc và được bay hơi đến khoảng 1/20 thể tích ban đầu. EtOAc (10 mL) được bổ sung vào, và dung dịch được rửa bằng 2N H_2SO_4 (30 mL) và tiếp đó với dung dịch NaCl (30 mL). Sau khi sấy khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc - $\rightarrow 4:6$ là dung dịch rửa giải) để tạo ra 12-benzoat-13-[(S)-(+)-2-metylbutyrat F (hợp chất 23) ở dạng bột màu trắng.

2.



Phản ứng với 12-axetyl-13-N-metylantranoyl-5,20-axetonit như mô tả: axit trifloaxetic (TFA) (300 μL ; 3% V/V) được bổ sung vào dung dịch chứa 12-axetyl-13-N-metylantranoyl-5,20-axetonit (100 mg; 0,16 mMol) trong CH_2Cl_2 (10 mL). Sau khi khuấy khoảng 12 giờ, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách rửa bằng [NaHCO_3 (≈ 10 mL) + nước muối (≈ 40 mL)] và tiếp theo và nước muối ($2 \times \approx 40$ mL). Sau khi sấy khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi, cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trọng lực trên silicagel (PE/EtOAc 8:2 $\rightarrow$ 2:8 là dung dịch rửa giải)

để tạo ra 12-axetyl-13-(N-metylantranoyl)-tiglian, 69 mg (75%) có dạng bột màu trắng.

Hợp chất 21, 22, 23, 28, 45, 47, 48, 50, 51, 52 và 53 được điều chế bằng các phương pháp này.

Hợp chất 21

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H, d, $J=6,6$ Hz), 0,93 (3 H, t, $J=7,4$ Hz), 1,21 (3 H, s), 1,23 (3 H, s), 1,29 (1 H, d, $J=6,7$ Hz), 1,64 (2 H, sxt, $J=7,6$ Hz), 1,73 (3 H, dd, $J=2,9$, 1,3 Hz), 1,77 (3 H, dq, $J=7,2$, 1,2 Hz), 1,79-1,81 (3 H, m), 1,95 (1 H, dd, $J=9,9$, 6,5 Hz), 2,24-2,38 (2 H, m), 3,16 (1 H, d, $J=6,7$ Hz), 3,26 (1 H, d, $J=0,5$ Hz), 3,65 (1 H, s), 3,83 (2H, dd, $J=13,3$, 12,5 Hz), 3,94 (1 H, d, $J=3,1$ Hz, OH), 4,06 (1 H, t, $J=2,6$ Hz), 4,22 (1 H, s), 5,41 (1 H, d, $J=9,9$ Hz), 5,82-6,00 (1 H, br, s., OH), 6,80 (1 H, qq, $J=7,1$, 1,4 Hz), 7,71 (1 H, dd, $J=2,6$, 1,3 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,72, 12,20, 13,62, 14,43, 15,07, 17,12, 18,03, 23,66, 26,35, 35,98, 36,03, 36,13, 45,76, 48,92, 61,77, 64,56, 65,23, 65,65, 71,36, 72,41, 76,74, 77,20, 128,38, 133,46, 137,73, 164,63, 167,62, 176,12, 209,88.

Hợp chất 22

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3 H, d, $J=7,3$ Hz), 0,86 (3 H, t, $J=7,2$ Hz), 1,20 (3 H, s), 1,21 (3 H, s), 1,20-1,40 (10 H, m), 1,29 (1 H, d, $J=6,8$ Hz), 1,67 (2 H, d, $J=13,7$ Hz), 1,75 (3 H, dd, $J=2,9$, 1,0 Hz), 1,88-1,92 (2H, m) 1,89-1,95 (1H, m), 3,07 (2H, dd, $J=6,8$, 1,5 Hz), 3,15 (1 H, d, $J=6,4$ Hz), 3,26 (1 H, s), 3,85 (2 H, dd, $J=12,7$, 4,4 Hz), 4,04 (1 H, d, $J=2,9$ Hz), 4,21 (1 H, s), 5,13-5,15 (1 H, m), 5,16-5,18 (1 H, m), 5,35 (1 H, d, $J=9,8$ Hz), 5,82-5,92 (1 H, m), 7,70 (1 H, dd, $J=2,4$, 1,0 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm: 9,74, 14,08, 15,12, 17,03, 22,63, 23,69, 24,48, 26,51, 29,07, 29,08, 29,19, 31,81, 34,25, 36,01, 36,04, 39,29, 45,50, 48,94, 61,69, 64,54, 65,21, 65,49, 71,58, 72,35, 77,17, 77,41, 118,62, 130,03, 133,55, 164,54, 171,11, 176,25, 209,86.

Hợp chất 23

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,90 (3 H, d, $J=6,5$ Hz), 0,94 (3 H, t, $J=7,5$ Hz), 1,14 (3 H, d, $J=7,1$ Hz), 1,22 (3 H, s), 1,32 (1 H, d, $J=6,6$ Hz), 1,35 (3 H, s), 1,41-1,51 (1 H, m, $J=14,1, 7,5, 7,0$ Hz), 1,69-1,79 (1 H, m), 1,73 (3 H, dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 2,08 (1 H, dq, $J=9,9, 6,5$ Hz), 2,39 (1 H, sxt, $J=7,0$ Hz), 3,24 (1 H, d, $J=6,6$ Hz), 3,29 (1 H, s), 3,84 (2 H, dd, $J=12,8, 1,3$ Hz), 4,10 (1 H, t, $J=2,5$ Hz), 4,24 (1 H, d, $J=0,7$ Hz), 5,62 (1 H, d, $J=9,9$ Hz), 6,07 (1 H, br, s, OH), 7,43 (2 H, t, $J=7,7$ Hz), 7,55 (1 H, tt, $J=7,5, 1,3$ Hz), 7,72 (1 H, dd, $J=2,6, 1,3$ Hz), 7,99 (2 H, dm, $J=8,4, 1,3$ Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,73, 11,61, 15,14, 16,14, 17,32, 23,63, 26,18, 26,82, 36,03, 36,34, 41,22, 45,92, 48,92, 61,86, 64,59, 65,20, 65,48, 71,27, 72,46, 77,23, 77,60, 128,44 (2 C), 129,70 (2 C), 130,02, 133,07, 133,52, 164,54, 165,94, 179,00, 209,84.

Hợp chất 27

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3 H, d, $J=6,5$ Hz), 0,93 (6 H, t, $J=7,4$ Hz), 1,20 (6 H, s), 1,28 (1 H, d, $J=6,6$ Hz), 1,58-1,68 (4 H, m), 1,74 (3 H, d, $J=1,8$ Hz), 1,91 (1 H, dq, $J=10,0, 6,4$ Hz), 2,20-2,36 (4 H, m), 3,14 (1 H, d, $J=6,6$ Hz), 3,25 (1 H, s), 3,63 (1 H, s, OH), 3,76-3,86 (1 H, m), 3,93 (1 H, d, $J=3,1$ Hz, OH), 4,05 (1 H, d, $J=2,4$ Hz), 4,21 (1 H, d, $J=2,4$ Hz), 5,36 (1 H, d, $J=10,0$ Hz), 5,84 (1 H, br, s, OH), 7,70 (1 H, s).

^{13}C NMR (125 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm: 9,72, 13,46, 13,62, 15,04, 17,02, 18,01, 18,61, 23,66, 26,34, 35,90, 35,95, 36,14, 36,38, 45,42, 48,90, 61,79, 64,58, 65,21, 65,60, 71,34, 72,40, 76,59, 77,18, 133,49, 164,54, 173,30, 176,05, 209,85.

Hợp chất 28

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,91 (3 H, d, $J=6,6$ Hz), 0,96 (3 H, t, $J=7,4$ Hz), 1,21 (3 H, s), 1,34 (3 H, s), 1,36 (1 H, d, $J=3,4$ Hz), 1,60 - 1,72 (2 H, m), 1,74 (3 H, d, $J=2,1$ Hz), 2,09 (1 H, dd, $J=9,8, 6,5$ Hz), 2,31 (1 H, t, $J=15,9, 7,6$ Hz), 2,38 (1 H, t, $J=15,9, 7,6$ Hz), 3,24 (1 H, d, $J=6,7$ Hz), 3,29 (1 H, s), 3,80 (1 H, d, $J=12,4$ Hz), 3,87 (1 H, d, $J=12,4$ Hz), 4,09 (1 H, d, $J=2,7$ Hz), 4,24 (1 H, s), 5,62 (1 H, d, $J=9,9$ Hz), 7,43 (2 H, t, $J=7,7$ Hz), 7,56 (1 H, t, $J=7,4$ Hz), 7,73 (1 H, s), 7,99 (2 H, d, $J=7,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,73, 13,65, 15,16, 17,25, 18,07, 23,66, 26,59, 36,07, 36,18, 36,23, 45,80, 48,95, 61,74, 64,55, 65,23, 65,62, 71,54, 72,40, 77,21, 77,63, 128,46 (2 C), 129,72 (2 C), 129,98, 133,12, 133,56, 164,57, 166,15, 176,19, 209,88.

Hợp chất 41

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=7,3$ Hz), 0,85 (3H (9'), t, $J=7,3$ Hz), 0,86 (3H (9''), t, $J=6,8$ Hz), 1,20 (3H (16), s), 1,20 (3H (17), s), 1,22-1,30 (10H (4', 5', 6', 7', 8'), m), 1,22-1,30 (10H (4'', 5'', 6'', 7'', 8''), m), 1,28 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,53-1,62 (2H (3''), m), 1,56-1,63 (2H (3'), m), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,90 (1H (11), dq, $J=10,1, 6,5$ Hz), 2,19 (1H (20-OH), t, $J=6,8$ Hz), 2,24-2,32 (2H (2'), m), 2,29-2,37 (2H (2''), m), 3,14 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,59 (1H (4-OH), s), 3,78 (1H (20), dd, $J=12,5, 5,2$ Hz), 3,82-3,87 (1H (20), m, $J=12,5, 7,3$ Hz), 3,89 (1H (5-OH), d, $J=3,1$ Hz), 4,05 (1H (10), dq), 4,21 (1H (5), d, $J=2,6$ Hz), 5,36 (1H (12), d, $J=10,4$ Hz), 5,86 (1H 9-OH), br, s), 7,70 (1H (1), dd, $J=2,6, 1,6$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 14,1 (9''), 14,1 (9'), 15,1 (18), 17,0 (16), 22,6 (8''), 22,6 (8'), 23,7 (17), 24,5 (3''), 25,2 (3'), 26,3 (15), 28,99 (4''), 29,07 (6'), 29,07 (6''), 29,15 (4'), 29,18 (5''), 29,2 (4'), 29,22 (5'), 31,78 (7''), 31,80 (7'), 34,3 (2''), 34,5 (2'), 35,9 (14), 36,0 (8), 45,4 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,6 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,5 (12), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,6 (1), 173,5 (1'), 176,2 (1''), 209,9 (3).

Hợp chất 42

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, $J=6,2$ Hz), 0,87 (3H (6'), t, $J=7,0$ Hz), 0,88 (3H (6''), t, $J=7,0$ Hz), 1,20 (3H (17), s), 1,21 (3H (16), s), 1,25-1,31 (2H (4'), m), 1,25-1,31 (2H (4''), m), 1,26-1,32 (2H (5''), m), 1,26-1,32 (2H (5'), m), 1,27-1,29 (1H (14), m, $J=6,8$ Hz), 1,57-1,62 (2H (3''), m), 1,58-1,63 (2H (3'), m), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,91 (1H (11), dq, $J=10,1, 6,5$ Hz), 2,20 (1H (20-OH), t, $J=6,8$ Hz), 2,26-2,30 (2'), m), 2,29-2,34 (2H (2''), m), 3,14 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,59 (1H (4-OH), d, $J=1,0$ Hz), 3,78 (1H (20), dd, $J=12,5, 5,2$ Hz), 3,82-3,87 (1H, (20), m), 3,88 (1H (5-OH), d, $J=3,1$ Hz), 4,05 (1H (10), t, $J=2,6$ Hz), 4,21 (1H (5), d, $J=3,6$ Hz), 5,36 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,86 (1H, (9-OH), br,s), 7,70 (1H (1), dd, $J=2,3, 1,3$ Hz),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 13,8 (6''), 13,9 (6'), 15,1 (18), 17,0 (16), 22,26 (5''), 22,3 (5'), 23,7 (17), 24,1 (3''), 24,8 (3'), 26,3 (15), 31,1 (4''), 31,2 (4'), 34,2 (2''), 34,5 (2'), 35,9 (14), 36,0 (8), 45,4 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,6 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,5 (12), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,6 (1), 173,5 (1'), 176,2 (1''), 210,0 (3).

Hợp chất 43

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=6,5$ Hz), 0,89 (3H (5'), t, $J=7,2$ Hz), 0,90, (3H (5''), t, $J=7,3$ Hz), 1,21 (3H (16), s), 1,21 (3H (17), s), 1,28 (1H (14), d, $J=6,6$ Hz), 1,29-1,37 (2H (4''), m), 1,29-1,38 (2H (4'), m), 1,55-1,59 (2H (3''), m), 1,56-1,62 (2H (3'), m), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,2$ Hz), 1,91 (1H (11), dq, $J=10,1, 6,5$ Hz), 2,19 (1H (20-OH), t, $J=6,6$ Hz), 2,24-2,32 (2H (2'), m), 2,30-2,38 (2H (2''), m), 3,15 (1H (8), d, $J=6,6$ Hz), 3,25 (1H (7), s), 3,59 (1H (4-OH), s), 3,78 (1H (20), dd, $J=12,6, 5,2$ Hz), 3,85 (1H (20), dd, $J=12,6, 7,4$ Hz), 3,88 (1H (20-OH), d, $J=3,1$ Hz), 4,05 (1H (10), t, $J=2,6$ Hz), 4,21 (1H (5), d, $J=2,3$ Hz), 5,36 (1H (12), d, $J=10,0$ Hz), 5,85 (1H (9-OH), br, s), 7,70 (1H (1), dd, $J=2,3, 1,4$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 13,65 (5''), 13,68 (5'), 15,1 (18), 17,0 (16), 22,1 (4''), 22,2 (4'), 23,7 (17), 26,4 (15), 26,5 (3''), 27,2 (3'), 34,0 (2''), 34,2 (2'),

35,9 (14), 36,0 (8), 45,5 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,6 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,6 (12), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,6 (1), 173,5 (1'), 176,2 (1''), 209,9 (3).

Hợp chất 44

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,86 (3H (18), d, $J=6,2$ Hz), 1,24 (3H (16), s), 1,26 (3H (17), s), 1,33 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,76-1,78 (2H (4'), m), 1,77-1,79 (2H (4''), m), 1,78-1,79 (3H (5''), m), 1,80-1,81 (3H (5'), m), 1,97 (1H (11), dq, $J=9,9, 6,4$ Hz), 2,19 (1H (20-OH), br,s), 3,18 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,27 (1H (7), s), 3,60 (1H (4-OH), s), 3,74-3,81 (1H (20), m), 3,86 (1H (20), br, s), 3,89 (1H (5-OH), br, s), 4,04-4,11 (1H (10), m), 4,22 (1H (5), s), 5,45 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 6,28 (1H (9-OH), br, s), 6,75-6,83 (1H (3'), m), 6,85-6,94 (1H (3''), m), 7,72 (1H (1), dd, $J=2,6, 1,6$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,8 (5''), 12,2 (5'), 14,4 (4'), 14,7 (4''), 15,2 (18), 17,3 (16), 23,7 (17), 26,8 (15), 36,1 (8), 36,2 (14), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,5 (20), 65,3 (7), 65,6 (13), 71,7 (5), 72,4 (4), 77,0 (12), 77,2 (9), 128,2 (2'), 128,5 (2''), 133,4 (2), 137,6 (3'), 139,8 (3''), 164,9 (1), 167,5 (1'), 169,7 (1''), 210,0 (3).

Hợp chất 45

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,79 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 0,93 (3H (4'''), t, $J=7,5$ Hz), 1,13 (3H (5'''), d, $J=7,0$ Hz), 1,24 (3H (17), s), 1,28 (3H (16), s), 1,28 (1H (14), d, $J=6,7$ Hz), 1,45 (1H (3'''), dq, $J=14,1, 7,3$ Hz), 1,69-1,76 (1H (3''), m), 1,71 (3H (19), dd, $J=2,8, 1,4$), 1,77 (3H (4''), dq, $J=7,1, 1,1$ Hz), 1,79-1,81 (3H (5''), m), 1,90 (1H (11), dq, $J=9,8, 6,5$ Hz), 2,01 (3H (2'''), s), 2,18 (3H (2'), s), 2,38 (1H (2''), sxt, $J=7,0$ Hz), 2,99 (1H (4-OH), s), 3,15 (1H (7), s), 3,26 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,54 (1H (20), d, $J=12,1$ Hz), 4,14-4,17, (1H (10), m), 4,69 (1H (20), d, $J=12,1$ Hz), 5,42 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,52 (1H (5), s), 5,98 (1H (9-OH), br,s), 6,80 (1H (3''), qq, $J=7,1, 1,3$ Hz), 7,62 (1H (1), dd, $J=2,3, 1,2$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,8 (19), 11,6 (4'''), 12,2 (5''), 14,4 (4''), 15,0 (18), 16,2 (5'''), 17,3 (16), 20,7 (2'''), 20,8 (2'), 23,7 (17), 26,2 (3'''), 26,7 (15), 36,0 (14), 36,1 (8), 41,2 (2'''), 45,8 (11), 49,4 (10), 60,4 (6), 65,4 (7), 65,6 (13), 66,3 (20), 68,1 (5), 71,8 (4), 76,7 (12), 76,9 (9), 128,5 (2''), 133,8 (2), 137,6 (3''), 162,5 (1), 167,4 (1''), 168,8 (1'), 170,6 (1'''), 178,9 (1'''), 206,3 (2).

Hợp chất 46

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,87 (3H (18), d, $J=6,6$ Hz), 1,23 (3H (16), s), 1,25 (3H (17), s), 1,34 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,75 (3H (19), dd, $J=2,6, 1,0$ Hz), 1,82-1,85 (3H (6'), m), 1,82-1,85 (3H (6''), m), 1,93-1,99 (1H (11), m), 3,17 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,27 (1H (7), br,s), 3,78 (1H (20), d, $J=12,6$ Hz), 3,85 (1H (20), d, $J=12,2$ Hz), 4,05-4,08 (1H (10), m), 4,22 (1H (5), d, $J=1,6$ Hz), 5,47 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,73 (1H (2'), d, $J=15,2$ Hz), 5,75 (1H (2''), d, $J=15,1$ Hz), 6,08-6,19 (1H (4'), m), 6,08-6,19 (1H (4''), m), 6,14-6,19 (1H (5'), m), 6,15-6,18 (1H (5''), m), 7,16-7,23 (1H (3'), m), 7,26-7,33 (1H (3''), m), 7,71-7,73, (1H (1), m).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 15,2 (18), 17,2 (16), 18,7 (6'), 18,7 (6''), 23,6 (17), 26,7 (15), 36,1 (8), 36,2 (14), 45,9 (11), 49,0 (10), 61,6 (6), 64,6 (20), 65,3 (7), 65,6 (13), 71,7 (5), 72,4 (4), 77,0 (12), 77,1 (9), 117,7 (2''), 118,7 (2'), 129,7 (4'), 129,7 (4''), 133,4 (2), 139,7 (5'), 141,0 (5''), 145,5 (3'), 147,3 (3''), 164,8 (1), 166,8 (1'), 169,2 (1''), 210,0 (3).

Hợp chất 47

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,89 (3H (18), d, $J=6,7$ Hz), 0,90 (3H (6'), t, $J=6,7$ Hz), 1,28 (3H (16), s), 1,29-1,34 (2H (4'), m), 1,30-1,35 (2H (5'), m), 1,31 (3H (17), s), 1,40 (1H (14), d, $J=6,6$ Hz), 1,60-1,65 (2H (3'), m), 1,77 (3H (19), dd, $J=2,7, 1,2$ Hz), 1,97 (1H (11), dq, $J=9,9, 6,5$ Hz), 2,14 (1H (20-OH), dd, $J=7,4, 6,4$ Hz), 2,30 (2H, (2'), td, $J=7,4, 7,3$ Hz), 2,87 (3H (MeNH), d, $J=4,8$ Hz), 3,22 (1H (8), d, $J=6,6$ Hz), 3,29 (1H (7), s), 3,80 (1H (20), dd, $J=12,5, 5,7$ Hz), 3,86 (1H (20), dd, $J=12,9, 7,8$ Hz), 4,08-4,11 (1H (10), m), 4,24 (1H (5), d, $J=2,5$ Hz), 5,53 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 6,30-6,37 (1H (9-OH), m), 6,52 (1H (6''), ddd, $J=7,9, 7,0, 0,9$ Hz), 6,64

(1H (4''), d, J=8,4 Hz), 7,36 (1H (5''), ddd, J=8,4, 7,1, 1,4 Hz), 7,56 (1H (3''NH), q, J=4,8 Hz), 7,75 (1H, 7''), dd, J=8,2, 1,6 Hz), 7,72-7,76 (1H (1), m).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,8 (19), 14,0 (6'), 15,2 (18), 17,2 (16), 22,4 (5'), 23,9 (17), 24,9 (3'), 27,0 (15), 29,5 (MeNH), 31,2 (4'), 34,5 (2'), 36,1 (8), 36,2 (14), 45,7 (11), 49,0 (10), 61,8 (6), 64,6 (20), 65,4 (7), 65,5 (13), 71,6 (5), 72,4 (4), 76,8 (12), 77,4 (9), 108,6 (2''), 111,0 (4''), 114,5 (6''), 131,8 (7''), 133,6 (2), 135,6 (5''), 152,7 (3''), 164,4 (1), 170,2 (1''), 173,2 (1'), 209,9 (3).

Hợp chất 48

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0,9 (3H (18), d, J=6,6 Hz), 1,27 (3H (16), s), 1,32 (3H (17), s), 1,4 (1H (14), d, J=6,6 Hz), 1,77 (3H (19), dd, J=2,7, 1,0 Hz), 1,98 (1H (11), dq, J=9,9, 6,5 Hz), 2,05 (3H (2'), s), 2,88 (3H (MeNH), d, J=5,1 Hz), 3,22 (1H (8), d, J=6,6 Hz), 3,29 (1H (7), s), 3,80 (1H (20), dd, J=12,2, 5,2 Hz), 3,83-3,88 (1H (20), m), 4,09 (1H (10), br,s), 4,24 (1H (5), d, J=2,9 Hz), 5,49 (1H (12), d, J=9,9 Hz), 6,53 (1H (6''), t, J=7,6 Hz), 6,64 (1H (4''), d, J=8,6 Hz), 7,36 (1H (5''), ddd, J=8,4, 7,0, 1,6 Hz), 7,55 (1H (3''-NH), q, J=4,6 Hz), 7,73 (1H (1), s), 7,78 (1H (7''), dd, J=8,0, 1,6 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,8 (19), 15,3 (18), 17,2 (16), 21,0 (2'), 23,9 (17), 27,1 (15), 29,5 (MeNH), 36,1 (8), 36,3 (14), 45,8 (11), 49,0 (10), 61,8 (6), 64,6 (20), 65,3 (7), 65,4 (13), 71,6 (5), 72,4 (4), 77,3 (9), 77,4 (12), 108,6 (2''), 111,0 (4''), 114,5 (6''), 131,9 (7''), 133,6 (2), 135,6 (5''), 152,7 (3''), 164,4 (1), 170,3 (1''), 170,4 (1'), 209,9 (3).

Hợp chất 49

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, J=6,8 Hz), 0,86 (3H (7'), t, J=6,7 Hz), 0,86 (3H (7''), t, J=6,7 Hz), 1,20 (3H (16), s), 1,20 (3H (17), s), 1,22-1,32 (12 H, (4', 5', 6', 4'', 5'', 6''), m), 1,28 (1H (14), d, J=6,7 Hz), 1,55-1,63 (4H (3', 3''), m), 1,74 (3H (19), dd, J=2,6, 1,0 Hz), 1,90 (1H (11), m), 2,28 (2H (2''), m), 2,32 (2H (2'), m), 3,14 (1H (8), d, J=6,7 Hz), 3,25 (1H (7), s), 3,65 (1H (4-OH), s), 3,81 (2H (20), br,s), 3,97 (1H (5-OH), br,s), 4,05 (1H (10), t, J=2,6 Hz), 4,21 (1H (5), s),

5,35 (1H (12), d, J=9,9 Hz), 5,85 (1H (9-OH), br,s,), 7,70 (1H (1), dd, J=2,6, 1,6 Hz),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 14,0 (7'), 14,0 (7''), 15,0 (18), 17,0 (16), 22,4 (6''), 22,5 (6'), 23,7 (17), 24,4 (3'), 25,1 (3''), 26,3 (15), 28,7 (4'), 28,7 (4''), 31,4 (5'), 31,4 (5''), 34,3 (2'), 34,5 (2''), 35,9 (8), 35,9 (14), 45,4 (11), 48,9 (10), 61,8 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,6 (13), 71,3 (5), 72,4 (4), 76,5 (9), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,5 (1), 173,5 (1'), 176,2 (1''), 209,8 (2).

Hợp chất 50

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, J=6,8 Hz), 0,85 (3H (14'), t, J=6,8 Hz), 1,20 (3H (16), s), 1,20 (3H (17), s), 1,21-1,28 (20H (4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13'), m), 1,30 (1H (14), d, J=6,8 Hz), 1,60 (2H (3'), quin, J=7,3 Hz), 1,74 (3H (19), dd, J=2,9, 1,3 Hz), 1,91 (1H (11), dq, J=10,1, 6,5 Hz), 2,07 (3H, (2''), s), 2,23-2,34 (2H (2'), m), 3,14 (1H (8), d, J=6,8 Hz), 3,24 (1H (7), s), 3,46 (1H (5-OH), s), 3,65 (1H (4-OH), s), 3,77-3,83 (2H (20), m, J=3,1 Hz), 3,97 (1H (20-OH), d, J=3,1 Hz), 4,04 (1H (10), t, J=2,6 Hz), 4,21 (1H (5), d, J=2,1 Hz), 5,36 (1H (12), d, J=10,4 Hz), 5,70 (1H (9-OH), br,s,), 7,69 (1H (1), dd, J=2,6, 1,6 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 14,1 (14'), 15,0 (18), 17,0 (16), 21,0 (2''), 22,7 (13'), 23,6 (17), 25,1 (3'), 26,2 (15), 29,0 (4'), 29,2 (5'), 29,3 (6'), 29,5 (7'), 29,6 (8'), 29,6 (8'), 29,6 (9'), 29,6 (10'), 29,6 (11'), 31,9 (12'), 34,5 (2'), 35,8 (14), 35,9 (8), 45,3 (11), 48,9 (10), 61,8 (6), 64,6 (20), 65,2 (7), 65,8 (13), 71,2 (5), 72,4 (4), 76,5 (12), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,4 (1), 173,6 (1'), 173,6 (1''), 209,8 (3).

Hợp chất 51

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,84 (3H (18), d, J=6,8 Hz), 0,86 (3H (14'), t, J=7,0 Hz), 0,92 (3H (4''), t, J=7,5 Hz), 1,12 (3H (5''), d, J=6,8 Hz), 1,21 (3H (16), s), 1,22 (3H (17), s), 1,21-1,31 (20H (4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13'), m), 1,25 (1H (14), d, J=6,2 Hz), 1,44 (1H (3''), ddq, J=14,0, 7,1, 7,1 Hz), 1,60 (2H (3'), m), 1,71 (1H (3''), ddq, J=14,0, 7,5, 7,5 Hz), 1,75 (3H (19), dd, J=2,9, 1,3 Hz), 1,90 (3H (11), dq, J=10,1, 6,5 Hz), 2,18 (1H (20-OH), m, J=6,8, 4,7 Hz), 2,28 (2H (2'), m,

$J=11,4, 7,4$ Hz), 2,36 (2H (2''), sxt, $J=7,3$ Hz), 3,15 (1H (8), d, $J=6,8$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,57 (1H (4-OH), d, $J=1,0$ Hz), 3,78 (1H (20), dd, $J=12,5, 4,2$ Hz), 3,86 (1H (20), dd, $J=12,5, 6,8$ Hz), 3,87 (1H (5-OH), d, $J=3,1$ Hz), 4,05 (1H (10), m, $J=2,6$ Hz), 4,21 (1H (5), d, $J=2,6$ Hz), 5,37 (1H (12), d, $J=9,9$ Hz), 5,98 (1H (9-OH), br,s,), 7,71 (1H (1), dd, $J=2,6, 1,6$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,6 (4''), 14,1 (14'), 15,1 (18), 16,1 (5''), 17,2 (16), 22,7 (13'), 23,7 (17), 25,2 (2'), 26,2 (3''), 26,6 (15), 29,0 (5'), 29,3 (4'), 29,3 (4'), 29,5 (6'), 29,6 (8'), 29,6 (9'), 29,6 (10'), 29,7 (11'), 31,9 (12'), 34,6 (2'), 36,0 (8), 36,1 (14), 41,2 (2''), 45,6 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,5 (13), 71,6 (5), 72,4 (4), 76,5 (12), 77,2 (9), 133,5 (2), 164,7 (1), 173,3 (1'), 178,8 (1''), 209,9 (3).

Hợp chất 52

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,85 (3H (18), d, $J=6,8$ Hz), 0,90 (3H (4'), t, $J=7,5$ Hz), 1,11 (3H (5'), d, $J=7,3$ Hz), 1,19 (3H (16), s), 1,21 (3H (17), s), 1,31 (1H (14), d, $J=6,8$ Hz), 1,44-1,56 (1H (3'), m), 1,58-1,67 (1H (3'), m), 1,74 (3H (19), dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 1,88-1,96 (1H (11), m), 2,08 (3H (2''), s), 2,33-2,43 (2H (2'), m), 3,15 (1H (8), d, $J=6,2$ Hz), 3,25 (1H (7), s), 3,59 (1H (4-OH), br,s,), 3,78 (1H (20), d, $J=13,0$ Hz), 3,85 (1H (20), d, $J=12,5$ Hz), 4,05 (1H (10), t, $J=2,9$ Hz), 4,21 (1H (5), s), 5,38 (1H (12), d, $J=10,4$ Hz), 5,74 (1H (9-OH), br,s,), 7,71 (1H (1), dd, $J=2,3, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,7 (19), 11,3 (4'), 15,0 (18), 16,5 (5'), 17,0 (16), 21,0 (2''), 23,6 (17), 26,1 (15), 26,9 (3'), 35,7 (14), 35,9 (8), 41,2 (2'), 45,3 (11), 48,9 (10), 61,7 (6), 64,5 (20), 65,2 (7), 65,8 (13), 71,5 (5), 72,4 (4), 76,2 (12), 76,9 (9), 133,5 (2), 164,6 (1), 173,6 (1''), 176,4 (1'), 209,9 (3).

Hợp chất 53

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,88 (3H (6'), m, $J=7,3$ Hz), 1,06 (3H (18), d, $J=6,2$ Hz), 1,18 (3H (16), s), 1,25 (3H (17), s), 1,25 (1H (14), d, $J=7,3$ Hz), 1,27-1,33 (4H (4', 5'), m), 1,59-1,65 (2H (3'), m), 1,74-1,80 (1H (11), m), 1,76 (3H (19),

dd, $J=2,9, 1,3$ Hz), 2,23 (1H (20-OH), t, $J=6,2$), 2,35 (2H (2'), td, $J=7,5, 1,6$ Hz), 3,06 (1H (8), d, $J=7,3$ Hz), 3,26 (1H (7), s), 3,57 (1H (4-OH), s), 3,77 (1H (10), t, $J=2,6$ Hz), 3,81 (2H (20), dd, $J=7,3, 4,7$ Hz), 3,94 (1H (12), dd, $J=9,1, 1,3$ Hz), 4,2 (1H (5), s), 7,69, (1H (1), dd, $J=2,3, 1,3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9,8 (19), 13,9 (6'), 16,3 (18), 17,2 (16), 22,3 (5'), 23,3 (17), 24,5 (3'), 28,0 (15), 31,3 (4'), 34,0 (2'), 34,8 (14), 36,5 (8), 47,2 (11), 50,8 (10), 62,5 (6), 65,0 (20), 66,0 (7), 68,6 (13), 71,4 (5), 72,1 (4), 77,7 (9), 78,2 (12), 134,0 (2), 163,7 (1), 177,3 (1'), 209,6 (3).

Hợp chất 60

HPLC: Cột Kinetex C18 4,6 mm, 0,8 mL/phút, metanol-nước (70:30). Thời gian lưu giữ: 10,9 phút.

Ví dụ về các tác dụng *in vitro* đối với các loại tế bào có liên quan đến quá trình làm lành vết thương

Ví dụ 4: Sự làm kín miệng vết xước và sự di trú của nguyên bào sợi *in vitro*

Khả năng của các nguyên bào sợi bao quy đầu sơ sinh dẫn truyền sớm (NFF) được nuôi cấy trong RPMI 1640-10% huyết thanh bào thai bê để di trú dọc theo vết thương xước được tạo thành trong lớp đơn hợp dòng sau khi điều trị bằng các hợp chất được điều chế hoặc chất chiết thực vật được xác định bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp trong số ba phương pháp dưới đây.

Phương pháp 1

Các tế bào được gieo vào các đĩa có đường kính 16 mm (đĩa 24 lỗ), được để cho hợp dòng và tạo 2 vết xước cho mỗi lỗ bằng cách sử dụng đầu ống hút bằng nhựa vô trùng. Môi trường được loại bỏ, các lỗ được rửa bằng nước muối đệm phosphat có độ pH=7,2 (PBS) để loại bỏ các tế bào được thải loại, môi trường mới được bổ sung vào sau khi pha loãng 10 lần theo thứ tự hợp chất tinh khiết hoặc chất chiết thực vật (2 μ L). Ủ liên tục trong thời gian từ 16 đến 30 giờ. Thử nghiệm được

kết thúc khi rìa của vết xước trong các môi trường nuôi cấy không được xử lý gần bằng 25% kể từ ban đầu. Các lớp đơn được rửa bằng PBS, được cố định bằng etanol và được nhuộm bằng 0,05% tím tinh thể. Ảnh chụp bằng hiển vi của mỗi lỗ (kính hiển vi EVOS) được in ra và mỗi vết xước được đo ở 3 vị trí để xác định chiều rộng trung bình. Sự làm kín miệng vết thương đã tăng cường được xem là quan trọng nếu kể từ còn lại <40% kể từ của các đối chứng không được xử lý.

Phương pháp 2

Các tế bào được gieo trong các lỗ 6 mm (các đĩa 96 lỗ) hoặc 16 mm (các đĩa 24 lỗ), với từ 2 đến 6 lỗ lặp mỗi lần pha loãng, và được xử lý như trong phương pháp 1. Ngay sau khi điều trị, rìa của vết xước được vạch ra trên mặt bên dưới của lỗ bằng bút dạ đầu nhỏ. Sau khi cố định và nhuộm, sự di trú được đánh giá dưới kính hiển vi bằng sự hỗ trợ của ô vạch, cho điểm sự di trú là 0, 25, 50, 75 hoặc 100% (kín miệng hoàn toàn) chiều rộng ban đầu. Sự kín miệng vết thương nhanh chóng được xem là quan trọng nếu điểm tứ phân vị trung bình của các bản sao nhỏ hơn điểm tứ phân vị của các đối chứng không được điều trị ($p < 0,05$, thử nghiệm t). Ngoài ra, diện tích “vết thương” được tạo ra bằng cách gieo các tế bào với sự có mặt của đỉnh bằng thép không gỉ 3 mm (đĩa 96 lỗ), hoặc bằng cách chèn các vòng Teflon có gờ phẳng vào. Thiết bị này được loại bỏ sau khi ủ qua đêm các tế bào NFF.

Phương pháp 3

Các tế bào được gieo và được xử lý trong các đĩa 96 lỗ như trong phương pháp 2 (5 lỗ lặp mỗi lần pha loãng), ngoại trừ các vết xước được tạo thành trong một hoạt động bằng công cụ có 96, các đinh ghim được phủ teflon có độ dày 1mm (Essen Bioscience Woundmaker). Đĩa tiếp đó được đặt ở nhiệt độ 37°C, không khí được tạo ẩm CO₂ 5% trong dụng cụ IncuCyte FLR được lập chương trình để chụp ảnh cho mỗi lỗ dưới pha ngược ở khoảng thời gian 3 giờ trong thời gian 42 giờ. Phần mềm xác định được ranh giới của vết xước ban đầu và tốc độ kín miệng của chúng. Sự kín miệng vết thương nhanh chóng được xem là quan trọng nếu tốc độ kín miệng ban đầu >10% của các đối chứng không được điều trị.

Các kết quả được thể hiện trong các bảng từ 7 đến 9.

Bảng 7. Tốc độ kín miệng vết xước ở các nguyên bào sợi sơ sinh ở người sau khi điều trị bằng các hợp chất tinh khiết

Hợp chất	Phương pháp 1		Phương pháp 2		Phương pháp 3	
	Nồng độ thử nghiệm (ng/mL)	% kín miệng so với đối chứng	Nồng độ thử nghiệm (ng/mL)	% kín miệng so với đối chứng	Nồng độ thử nghiệm (ng/mL)	% kín miệng so với đối chứng
1	30	166	200	180	30	150
1	100	146			100	160
2	30	130			30	147
2	100	129				
3					200	270
5					30	209
5					200	300
8			200	190		
11					200	270
18					200	220
27			1000	158	2000	130
28					200	140
21					200	200
22					200	400
23					200	130

Các trị số in đậm, bóng màu xám thể hiện tốc độ kín miệng vết xước cao hơn đáng kể so với phương pháp điều trị đối chứng

Tất cả các hợp chất tinh khiết đều được chứng minh là có tốc độ kín miệng vết xước tăng lên đáng kể so với các phương pháp điều trị đối chứng chỉ có chất mang.

Bảng 8. Tốc độ kín miệng vết xước trong các nguyên bào sợi sơ sinh ở người sau khi điều trị bằng chất chiết etanolic không được cắt phân đoạn của các phần khác nhau của cây *Fontainea picrosperma*

Bộ phận của cây	Phương pháp 1		Phương pháp 2		Phương pháp 3	
	Pha loãng chất chiết	% kín miệng so với đối chứng	Pha loãng chất chiết	% kín miệng so với đối chứng	Pha loãng chất chiết	% kín miệng so với đối chứng
lá	5000	268	5000	300	5000	220
thân	5000	367				
vỏ	500	397	500	200		
nội nhũ	500	128	500	270		
vỏ quả ngoài	500	167				
quả chưa chín	5 x 10 ⁴	300				

Trị số in đậm, bóng màu xám thể hiện tốc độ kín miệng vết xước cao hơn đáng kể so với phương pháp điều trị đối chứng

Chất chiết thô etanolic của tất cả các bộ phận của cây *Fontainea picrosperma* được thử nghiệm có tốc độ kín miệng vết xước tăng cao đáng kể so với phương pháp điều trị đối chứng chỉ có chất mang.

Bảng 9. Tốc độ kín miệng vết xước trong các nguyên bào sợi sơ sinh ở người sau khi điều trị bằng chất chiết etanolic không được cắt phân đoạn từ các bộ phận khác nhau của cây trong số ba loài cây khác nhau

Bộ phận của cây	Phương pháp 1		Phương pháp 2		Phương pháp 3	
	Pha loãng chất chiết	% kín miệng so với đối chứng	Pha loãng chất chiết	% kín miệng so với đối chứng	Pha loãng chất chiết	% kín miệng so với đối chứng
<i>Fontainea australis</i>						
Lá					500	163
Thân					5000	203
<i>Fontainea rostrata</i>						
Lá	500	101			500	141
<i>Hylandia dockrillii</i>						
Lá	5000	187				

Thân	500	390			500	129
Vỏ	500	192	5000	121		
Quả	500	385				

Các trị số in đậm, bóng màu xám thể hiện tốc độ kín miệng vết xước cao hơn đáng kể so với phương pháp điều trị đối chứng

Chất chiết từ bộ phận của cây thuộc hai loài *Fontainea*, *F. australis* và *F. Rostrata* khác, và các loài có liên quan mật thiết *Hylandia dockrillii* chứng minh tốc độ kín miệng vết xước tăng đáng kể so với phương pháp điều trị đối chứng chỉ có chất mang.

Ngoài ra, việc quan sát các đĩa thử nghiệm dưới kính hiển vi (Phương pháp 1) đề xuất rằng các nguyên bào sợi biểu lộ tổng sự khác biệt trong mẫu nhuộm sau khi điều trị bằng Hợp chất 1. Nghiên cứu mới đây tiết lộ rằng điều này là do các tế bào phát triển rõ rệt theo kiểu tạo nhiều lớp, chỉ ra hiệu quả giảm sự ức chế tiếp xúc, tăng sự tăng sinh, hoặc khả năng tái tạo. Các ví dụ về sự kín miệng vết xước trong đối chứng và sự điều trị bằng Hợp chất 1 ở 24 giờ sau khi có vết xước được minh họa lần lượt trên các hình vẽ Fig. 1 và Fig. 2.

Ví dụ 5: Thử nghiệm xâm lấn matrigel về khả năng di trú của các nguyên bào sợi sơ sinh ở người

Các ngăn xâm lấn matrigel tạo ra các tế bào trong các điều kiện cho phép đánh giá đặc tính xâm lấn của chúng *in vitro*. Các ngăn xâm lấn Matrigel bao gồm đĩa đi kèm môi trường nuôi cấy tế bào được đưa môi trường nuôi cấy tế bào vào có chứa màng PET cỡ lỗ 8 micron với một lớp mỏng chứa chất nền màng cơ sở Matrigel. Chất nền Matrigel thích hợp là màng cơ sở được hoàn nguyên *in vitro*. Lớp hút giữ các lỗ trong màng, phong bế các tế bào không xâm lấn khỏi sự di trú thông qua màng. Ngược lại, các tế bào xâm lấn có khả năng tự tháo ra khỏi và tràn ra khắp chất nền Matrigel và lỗ màng 8 micron. Màng này có thể được xử lý bằng ánh sáng và kính hiển vi điện tử và có thể được loại bỏ dễ dàng sau khi nhuộm.

Các khoang được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, như được mô tả dưới đây trong hai nghiên cứu, để đánh giá các ảnh hưởng của các Hợp chất 1, 2, 5 và 42 đối với sự di trú của các nguyên bào sợi sơ sinh ở người. Các ảnh hưởng của ba nồng độ (0, 10 và 30 ng/mL) được đánh giá trong nghiên cứu đầu tiên của Hợp chất 1 đối với các nguyên bào sợi sơ sinh trong các lỗ chứa môi trường có huyết thanh bào thai bê 10%. Nghiên cứu thứ hai sử dụng hai nồng độ (0 và 30ng/mL) đối với mỗi hợp chất trong các Hợp chất 1, 2, 5 và 42 để nghiên cứu các ảnh hưởng đối với sự di trú của các nguyên bào sợi sơ sinh được lấy đi trong thời gian 2 ngày trước khi điều trị và tiếp đó được chuyển vào môi trường có 1% huyết thanh bào thai bê.

Phản ứng hydrat hóa lại

Gói chứa các khoang được lấy ra khỏi kho -20°C và được để đến nhiệt độ trong phòng. Làm ấm (37°C) môi trường nuôi cấy dựa trên bicarbonat được bổ sung vào phía trong các miếng chèn (500 µL) và đáy của các lỗ (750 µL). Các khoang chứa Matrigel được để hydrat hóa lại trong thời gian 2 giờ trong tủ ủ nuôi cấy mô được tạo ẩm, 37°C, 5% khí CO₂. Sau khi hydrat hóa lại, môi trường được loại bỏ cẩn thận bằng cách hút mà không làm xáo trộn lớp chất nền Matrigel™ trên màng.

Các nghiên cứu về sự xâm lấn

Các tế bào được thu lại, và được tạo hỗn dịch lại ở 20000 tế bào trên mỗi mL. Tổng số 250 µL hỗn dịch tế bào được đặt vào bên trong vật lỏng vào (5000 tế bào). 250 µL môi trường thêm vào chứa các hợp chất tương ứng tiếp đó được bổ sung vào bên trong của vật lỏng vào để tạo ra nồng độ cuối cùng mong muốn đối với mỗi nghiên cứu trong số hai nghiên cứu. Tổng số 750 µL môi trường chứa các nồng độ thích hợp của mỗi hợp chất trong mỗi lần điều trị được đặt vào lỗ trong vật lỏng vào thích hợp. Các ngăn Matrigel tiếp đó được ủ trong thời gian 24 giờ trong tủ ủ nuôi cấy mô được tạo ẩm, ở nhiệt độ 37°C, 5% khí CO₂.

Phép đo sự xâm lấn tế bào

Các tế bào không xâm lấn được loại bỏ khỏi mặt phía trên của màng bằng cách “chà”. Miếng gạc đầu bịt bông được nhúng vào vật lỏng vào sau khi loại bỏ môi trường, và áp suất nhất định được tác dụng trong khi đầu được di chuyển phía trên bề mặt màng. Việc chà được lặp lại bằng miếng gạc thứ hai được tạo ẩm bằng PBS. Các tế bào tràn ra khắp bề mặt phía ngoài của vật lỏng vào tiếp đó được cố định bằng cách đặt trong 500 μ L metanol 100% trong thời gian ít nhất 5 phút. Vật lỏng vào tiếp đó được chuyển vào đĩa đi kèm chứa 500 μ L tím tinh thể 0,1% trong metanol, và được nhuộm trong thời gian ít nhất 15 phút. Vật lỏng vào được làm mất màu bằng sự dẫn truyền qua 3 đĩa kèm theo chứa 500 μ L nước, trước khi được sấy khô bằng không khí.

Ngày tiếp theo, màng được loại bỏ khỏi vỏ bọc của vật lỏng vào bằng cách lộn ngược vật lỏng vào và lỏng đầu của lưỡi dao mổ nhọn qua màng tại gờ liền kề với thành vỏ bọc. Vỏ bọc của vật lỏng vào được quay quanh lưỡi tĩnh và màng được tách ra. Màng được làm bật ra khỏi vỏ bọc bằng fooc-xép, và được đặt quay xuống 10 μ L dung dịch glyxerol Kaiser và được phủ bằng lá kính dày. Các phiến kính được để khô qua đêm, trước khi đếm các tế bào xâm lấn.

Các kết quả

Trong nghiên cứu thứ nhất, các nguyên bào sợi được điều trị bằng 10 hoặc 30 ng/mL Hợp chất 1 thể hiện khả năng di trú tăng trong hệ thống ngăn xâm lấn Matrigel so với các tế bào được điều trị bằng chỉ bằng chất mang (Fig. 3). Nghiên cứu thứ hai xác nhận các kết quả của nghiên cứu thứ nhất bằng Hợp chất 1 và chứng minh các mức tương tự để làm tăng khả năng di trú đối với các Hợp chất 2, 5 và 42 (Bảng 10).

Bảng 10. Thử nghiệm xâm lấn matrigel của tế bào nguyên bào sợi mới sinh ở người được điều trị bằng 30 ng/mL mỗi hợp chất. Số liệu được thể hiện dưới dạng % sự tăng sự xâm lấn màng so với đối chứng chỉ có chất mang, độ lệch chuẩn dương hoặc âm từ hai thử nghiệm lặp. Các tế bào được đếm sau 24 giờ ủ

Hợp chất	Sự đếm tế bào dưới dạng % của đối chứng (Đối chứng = không có các hợp chất được bổ sung)
1	356 ± 141
2	366 ± 122
5	218 ± 21
42	350 ± 101

Ví dụ 6: Sự phục hồi quần thể vết xước và sự kín miệng các tế bào sừng ở người được làm cho bất tử (HaCaT) *in vitro*

Khả năng của các tế bào sừng ở người được làm cho bất tử (HaCaT) để di trú dọc theo vết thương có vết xước được tạo thành trong lớp đơn hợp dòng sau khi điều trị bằng Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 37 được xác định bằng phương pháp sau đây.

Các tế bào HaCaT đã trypsin hóa được gieo ở mật độ tế bào bằng $7,4 \times 10^4$ tế bào/mL trong các đĩa nuôi cấy mô (VWR International, UK) BD Falcon đáy phẳng 24-lỗ, trong 1 mL Môi trường Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), được bổ sung L-glutamin (2 mM), thuốc kháng sinh (100 U/mL penixilin G natri, 100 µg/mL streptomycin sulphat và 0,25 µg/mL amphotericin B); và 10% huyết thanh bào thai bê (tất cả Invitrogen Ltd., UK) để tạo ra mật độ tế bào bằng $7,4 \times 10^4$ tế bào được gieo trong mỗi lỗ. Các tế bào tiếp đó được giữ ở nhiệt độ 37°C trong không khí 5% CO₂/95% qua đêm. Vào buổi sáng tiếp theo, DMEM chứa 10% huyết thanh bào thai bê được thay thế bằng DMEM không chứa huyết thanh và các tế bào HaCaT sau đó được tách huyết thanh trong DMEM trong thời gian 48 giờ.

Sau thời gian 48 giờ, DMEM không chứa huyết thanh được loại bỏ và 'vết thương' có vết xước đơn bằng ống hút vô trùng dọc theo mỗi lớp tế bào. Rửa hai lần tiếp theo trong 1mL PBS, môi trường chứa Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 37 (1mL)

được bổ sung vào mỗi lỗ. Môi trường này có chứa DMEM, được bổ sung L-glutamin (2mM), thuốc kháng sinh (như trên) và 1% huyết thanh bào thai bê, cộng với Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 37 ở nồng độ cuối cùng bằng 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 10 hoặc 100 μ g/mL. Có ba lỗ lặp đối với mỗi nồng độ cho mỗi hợp chất.

Môi trường nuôi cấy HaCaT được giữ ở nhiệt độ 37°C trong không khí 5% CO₂/95% và sự phục hồi quần thể các vùng ‘vết thương’ đã lột trần được theo dõi bằng kính hiển vi cùng tiêu điểm quang thời gian (Leica TCS SP5 Confocal Microscope, Leica Microsystems UK Ltd., UK) có độ phóng đại 100 lần, có các ảnh bằng số được thu giữ ở các vị trí cố định 20 phút một lần trong khoảng thời gian 48 giờ. Thứ tự ảnh số được xuất ra và được chuẩn bị dưới dạng các tệp phim .avi, sử dụng phần mềm LAS AF (Leica Microsystems). Tốc độ kín miệng vết thương HaCaT *in vitro* được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm ImageJ (ImageJ 1.37v; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Số liệu được phân tích bằng phép phân tích phương sai một chiều cùng với phép phân tích Tukey sau thử nghiệm. Mỗi thử nghiệm được tiến hành dựa trên 3 thời điểm riêng rẽ.

Vào 48 giờ sau ứng dụng, Hợp chất 1 làm tăng đáng kể tốc độ kín miệng vết xước ($p<0,01$) so với phương pháp điều trị đối chứng ở các nồng độ 0,001, 0,01 và 0,1 ng/ml (Bảng 11). Tại 48 giờ, Hợp chất 37 cũng làm tăng tốc độ kín miệng vết xước ($p<0,01$) so với phương pháp điều trị đối chứng ở các nồng độ 0,001, 0,01, 0,1 và 1,0 μ g/ml (Bảng 11).

Bảng 11. Mức độ phục hồi quần thể và sự kín miệng vết xước bằng các tế bào sừng ở người được làm cho bất tử (HaCaT) ở 48 giờ sau khi điều trị trong khoảng nồng độ của Hợp chất 1 và Hợp chất 37. Số liệu về % vùng vết thương có vết xước để mở sau khi điều trị ($\pm$ các sai số chuẩn).

Hợp chất	Nồng độ của hợp chất (μ g hợp chất/ml môi trường sinh trưởng)					
	0	0,001	0,01	0,1	1,0	10
1	43,8 $\pm$ 3,6	8,6 $\pm$ 9,4	19,7 $\pm$ 9,3	21,4 $\pm$ 5,8	35,4 $\pm$ 7,9	45,5 $\pm$ 7,3
37	49,5 $\pm$ 5,4	4,3 $\pm$ 4,1	0,9 $\pm$ 1,5	2,2 $\pm$ 3,4	30,0 $\pm$ 5,3	37,1 $\pm$ 7,1

Để xác định xem liệu các ảnh hưởng của Hợp chất 1 và Hợp chất 37 có làm tăng sự phục hồi quần thể và sự kín miệng vết xước như được thể hiện trong Bảng 11 được trung gian bởi sự tăng sinh hoặc di trú tế bào, hai thử nghiệm khác được tiến hành. Thử nghiệm thứ nhất trong các thử nghiệm này đề cập đến các khía cạnh về sự di trú và lặp lại nghiên cứu phục hồi quần thể vết xước nhưng với sự bổ sung 1µg/mL Mitomycin C vào môi trường đồng thời với các hợp chất được ứng dụng. Mitomycin C được biết để ức chế sự tăng sinh tế bào, bao gồm tế bào trong các tế bào HaCaT; và được xác định không chỉ gây độc hại tế bào trong hệ thống nuôi cấy ở nồng độ 1µg/mL. Các kết quả của nghiên cứu di trú này thể hiện sự phục hồi quần thể của vết xước ($p < 0,05$) được tăng cường và sự kín miệng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1,0 µg/mL đối với cả Hợp chất 1 và Hợp chất 37.

Thử nghiệm tăng sinh đánh giá các ảnh hưởng của hai hợp chất đối với sự tăng sinh HaCaT (như được đo bằng MTT) trong hệ môi trường nuôi cấy ở 4 giai đoạn thời gian (24, 48, 120 và 168 giờ). Cả hai Hợp chất 1 và Hợp chất 37 đều có ảnh hưởng đáng kể ($p < 0,01$) đối với sự tăng sinh tăng của tế bào HaCaT trong khoảng nồng độ từ 0,001 đến 10µg/mL so với phương pháp điều trị đối chứng mà không bổ sung hợp chất.

Các kết quả này chứng minh rằng cả sự tăng sinh và sự di trú tế bào được tăng cường có liên quan đến sự phục hồi quần thể vết xước và quy trình kín miệng bằng các Hợp chất 1 và Hợp chất 37.

Ví dụ 7: Sự biệt hóa các bạch cầu đơn nhân to thành các đại thực bào bằng các hợp chất

Đại thực bào đóng nhiều vai trò trong quá trình làm lành vết thương, bao gồm sự làm sạch mảnh vụn tế bào và mô hoại tử trong giai đoạn viêm, sớm sau đó bằng sự hỗ trợ sự tăng sinh tế bào và sự phục hồi mô trong các giai đoạn làm lành sau đó.

Kiểu hình M1 được xem là có liên quan đến giai đoạn viêm sớm và kiểu hình M2 với giai đoạn làm lành.

Để xác định các ảnh hưởng có hiệu quả của Hợp chất 1 và mười lăm hợp chất epoxy-tiglian khác trong bảng dựa trên sự biệt hóa bạch cầu đơn nhân to, tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (PBMC) được phân lập bởi sự lắng đọng Ficoll-Paque trong máu được heparin hóa từ người cho là nam 72 tuổi, và được dàn trên đĩa ở 100000 tế bào/lỗ trong RPMI-1640 10% FCS. Các lỗ lặp được xử lý bằng cách pha loãng 10 lần các hợp chất và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 4 ngày. Các lỗ được cho điểm bằng mắt thường về sự gắn và hình thái học của tế bào, tiếp đó được rửa hai lần bằng PBS, được nhuộm bằng sulfurhodamin và việc nhuộm kết hợp được định lượng trong máy đọc ELISA. Các đĩa tiếp đó được rửa bằng nước và được nhuộm bằng 1% tím tinh thể trong metanol để chụp ảnh và cho điểm hình thái học của tế bào dính bám.

Các kết quả từ thử nghiệm đáp ứng liều dùng với PBMC ở người (Bảng 12) cho thấy rằng tất cả mười sáu hợp chất epoxy-tiglian đã thử nghiệm các bạch cầu đơn nhân trong máu ngoại vi đã biệt hóa thử nghiệm thành các đại thực bào ở nồng độ ng, được đánh giá bởi sự dính bám và hình thái học là hỗn hợp của các tế bào đuôi gai điển hình của kiểu hình M2, và các tế bào tròn đặc trưng cho kiểu hình M1.

Bảng 12. Nồng độ điểm cuối theo thứ tự pha loãng để cảm ứng kiểu hình của đại thực bào trong bạch cầu đơn nhân to máu ngoại vi ở người bằng hợp chất epoxy-tiglian trong dãy

Hợp chất	Điểm cuối biệt hóa (ng/mL)
1	1
2	1
3	10
5	1
8	10
21	10
22	100
23	1

24	1
41	0,1
42	1
49	1
50	1
51	1
52	10
53	100

Ví dụ 8: Ảnh hưởng của các hợp chất 1 và 37 đối với sự biệt hóa các nguyên bào sợi da người trưởng thành thành u nguyên bào sợi

Các nguyên bào sợi đóng vai trò trung tâm trong quá trình làm lành vết thương và khi được hoạt hóa, chúng biệt hóa thành kiểu hình nguyên bào sợi cơ được đặc trưng bởi sự biểu hiện của actin cơ trơn α (α -SMA). Trong khi u nguyên bào sợi góp phần vào việc sửa chữa mô và sự kín miệng của vết thương, sự biểu hiện quá mức của chúng có liên quan đến sự làm lành bị suy giảm và sự hình thành sẹo quá mức.

Ảnh hưởng của các Hợp chất 1 và Hợp chất 37 đối với sự biệt hóa nguyên bào sợi da với u nguyên bào sợi được thử nghiệm bằng mức độ biểu hiện α -SMA bằng các nguyên bào sợi da được kích thích bằng TGF- β_1 .

Phương pháp

Sau quá trình trypsin hóa, các nguyên bào sợi được cấy vào các phiến kính Permanoxchamber 8 lỗ (VWR International) trong môi trường DMEM, có chứa thuốc kháng sinh, 2 mM L-glutamin và 10% huyết thanh bào thai bê (250 μ L, tất cả đều mua được từ Invitrogen); ở mật độ tế bào là $2,5 \times 10^4$ tế bào/lỗ và được giữ ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂/95% không khí trong thời gian 48 giờ.

Ở 48 giờ, các nguyên bào sợi bị bắt giữ tăng trưởng trong DMEM không có huyết thanh trong thời gian 48 giờ và tiếp đó được thay thế bằng DMEM không có huyết thanh (250 μ L), có chứa các Hợp chất 1 hoặc Hợp chất 37 ở các nồng độ bằng 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 và 10,0 μ g/mL (3 lỗ/nồng độ/ hợp chất) và TGF- β_1 (10ng/ml,

Peprtech). Các nguyên bào sợi được giữ ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO₂/95% không khí trong thời gian 72 giờ.

Ở 72 giờ, các lỗ phiên kính trong khoang được rửa bằng PBS (1 lần, 250 µL) và được cố định trong 4% paraformaldehyt (100 µL/lỗ) trong thời gian 10 phút. Các lỗ phiên kính trong khoang tiếp đó được rửa lại bằng PBS (1 lần, 250 µL), được xử lý bằng 0,1% Triton X-100 trong PBS (100 µL, Sigma) trong thời gian 5 phút và được rửa lại bằng PBS (1 lần, 250 µL). Các lỗ được phong bế bằng 1% BSA trong PBS (250 µL, Sigma) trong thời gian 1 giờ và được rửa (3 lần) trong 0,1% BSA/PBS.

Các lỗ được ủ bằng kháng thể đơn dòng của chuột kháng α -SMA ở người, dòng vô tính 1A4 (1:100, 150ul, Sigma) ở nhiệt độ 4°C qua đêm, được rửa (6 lần) trong 0,1% BSA/PBS và được ủ bằng kháng thể của dê kháng IgG ở chuột Alexa Fluor 488 (1:1000, 250 µL, Invitrogen), ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ, trong bóng tối. Các phiên kính trong khoang được rửa (6 lần) trong 0,1% BSA/PBS và được nhuộm tương phản bằng dung dịch Hoescht 33258 trong thời gian 30 phút trong bóng tối (1:2000, 250 µL, Sigma). Khoang sau đó được loại bỏ phiên kính và được xử lý bằng Fluorsave (Santa Cruz) trong thời gian 10 phút trong bóng tối. Các phiên kính được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (Leica Microsystem), bằng các ảnh kỹ thuật số có độ phóng đại capturedat x200. Các ảnh kỹ thuật số được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm HC Image J.

Kết quả

Trong phương pháp điều trị đối chứng bằng TGF- β ₁ nhưng không bổ sung các Hợp chất, các nguyên bào sợi da trưởng thành được biệt hóa thành u nguyên bào sợi, thường được mô tả bằng sự biểu hiện α -SMA tăng cao, cụm sợi stress α -SMA và sự phát triển tổng thể của hình thái học tế bào đa giác, được mở rộng. Ngược lại, sự phơi nhiễm của các nguyên bào sợi da trưởng thành được điều trị bằng TGF- β ₁ với Hợp chất 1 và Hợp chất 37 ảnh hưởng đến sự biệt hóa thành u nguyên bào sợi theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Trong trường hợp của Hợp chất 1 ở nồng độ 0,1 µg/mL,

môi trường nuôi cấy nguyên bào sợi thiếu sự hình thành sợi stress α -SMA và hình thái học tế bào đa giác điển hình, đại diện cho sự biệt hóa nguyên bào sợi cơ (Fig. 5). Đối với Hợp chất 37, đã có tác động phá vỡ sự hình thành sợi stress α -SMA và sự phát triển hình thái học đa giác ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 6).

Hơn nữa, dường như có những thay đổi nhỏ về hình thái của nguyên bào sợi cơ trong khoảng nồng độ từ 1 đến 10 $\mu\text{g/mL}$ đối với Hợp chất 1 và nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,0 $\mu\text{g/mL}$ đối với Hợp chất 37 (Fig. 5 và Fig. 6).

Tác động cụ thể của các hợp chất đối với sự biệt hóa nguyên bào sợi/nguyên bào sợi cơ có thể liên quan đến sự hình thành sẹo tối thiểu được quan sát thấy ở các vết thương được điều trị *in vivo* bằng Hợp chất 1 (Các ví dụ 16 và 17).

Ví dụ 9: Cảm ứng sự bùng nổ oxy phản ứng bằng các bạch cầu trung tính để phản ứng với Hợp chất 1

Bạch cầu trung tính là các tế bào thực bào chuyên dụng của hệ thống miễn dịch bẩm sinh và sự xâm nhập và kích hoạt của chúng là cần thiết để loại bỏ vi khuẩn, nấm và các mảnh vụn tế bào trong giai đoạn đầu của quá trình lành vết thương. Hoạt tính kháng khuẩn rộng của bạch cầu trung tính dựa trên một số chiến lược bao gồm sự bùng nổ của các dạng oxy phản ứng (ROS).

Một nghiên cứu đã được thực hiện để đánh giá tác động tiềm năng của Hợp chất 1 trong việc cảm ứng sự bùng nổ oxy phản ứng bằng các bạch cầu trung tính.

Bạch cầu trung tính được phân lập từ máu tươi của người cho khỏe mạnh bằng cách làm tiêu pelet tế bào máu đỏ thu được bằng phương pháp lắng Ficoll-Paque. Bạch cầu trung tính ($\sim 4 \times 10^6$ tế bào/ml) được ủ với 10 $\mu\text{g/mL}$ dihydroethidi (DHE) (Sigma-Aldrich) trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 15 phút cùng với một phần phân ước tế bào không nhuộm màu để được thử

nghiệm là đối chứng không được nhuộm. Việc ủ này tiếp theo phương pháp điều trị bằng Hợp chất 1 ở một loạt các nồng độ (0, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) trong thời gian 15 phút. Việc tạo ra các dạng oxy phản ứng sau khi ủ được xác định bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng FACS Canto để đo sự phát huỳnh quang do quá trình oxy hóa DHE thành ion ethidi.

Nghiên cứu này cho thấy rằng không có sự sản sinh ROS trong phương pháp điều trị đối chứng mà không có Hợp chất 1 hiện diện. Ngược lại, Hợp chất 1 kích thích việc sản sinh đáng kể các dạng oxy phản ứng (ROS) theo cách phụ thuộc vào liều lượng, với việc sản xuất ROS tăng theo nồng độ của Hợp chất 1.

Ví dụ về ảnh hưởng của các hợp chất đối với protein, gen và xytokin có liên quan đến việc cải thiện hiệu quả làm lành vết thương

Ví dụ 10: Phân tích phân tử các nguyên bào sợi sơ sinh ở người được điều trị bằng các Hợp chất 1 và Hợp chất 42

Phương pháp Western Blot được sử dụng để nhận biết ảnh hưởng của các Hợp chất 1 và Hợp chất 42 đối với các protein có liên quan đến việc sửa chữa và làm lành vết thương trong tế bào nguyên bào sợi mới sinh ở người (NFF). Hai nghiên cứu được tiến hành. Trong nghiên cứu đầu tiên, các NFF được điều trị bằng 10 hoặc 30 ng Hợp chất 1/mL trong thời gian 6 hoặc 24 giờ, trước khi thu và chiết protein. Trong nghiên cứu thứ hai, các NFF được điều trị riêng lẻ bằng 30 ng/mL nồng độ của các Hợp chất 1 và Hợp chất 42 tương ứng trong thời gian 6 giờ. Dịch tan tạo thành từ cả hai nghiên cứu được phân tích Western Blot, và thăm dò các kháng thể đặc trưng với các phân tử truyền tín hiệu chính có liên quan đến việc sửa chữa và làm lành vết thương.

Chuẩn bị các mẫu protein cho thử nghiệm Western Blot

Môi trường từ các nguyên bào sợi sơ sinh bám dính ở người phát triển trong các đĩa 75 cm² đã được loại bỏ và các tế bào được rửa hai lần trong PBS lạnh bằng.

Các tế bào dính kèm được thu trong 10 mL PBS lạnh bằng cách sử dụng vật dụng nạo tế bào (Costar®, Corning) được tạo pelet bằng cách ly tâm trong thời gian 5 phút (1500 vòng/phút, RTemp), được tạo hỗn dịch lại trong 1 mL PBS lạnh bằng, và được chuyển vào ống ly tâm 1,5 mL. Các tế bào được thu bằng cách ly tâm (13200 vòng/phút, RTemp, 2 giây), PBS được loại bỏ và các pelet được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi cần.

Các pelet đông lạnh được rã đông trên đá, và được tạo hỗn dịch lại ở thể tích dung dịch đệm ly giải tế bào gấp 3 đến 4 lần thể tích của pelet đó bằng cách hút pipet lên và xuống. Hỗn dịch tế bào được hòa tan bằng sóng siêu âm 60 giây ở nhiệt độ 4°C và được ly tâm trong thời gian 20 phút (13200 vòng/phút, 4°C) và pha giữa chứa protein được chuyển vào ống ly tâm 1,5 ml mới. Protein được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Xác định nồng độ của protein

Nồng độ của protein được xác định bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm protein BCA (Pierce). Phương pháp này dựa trên phản ứng khử Cu^{2+} thành Cu^{1+} bằng protein trong dung dịch kiềm. Cu^{1+} được tạo ra sau đó được chelat hóa bằng axit bixincronic (BCA) tạo ra sản phẩm phản ứng màu tím.

Các mẫu protein được pha loãng 1/10 và 1/20 (thể tích/thể tích) trong nước MilliQ và 10 μL được đưa theo lần lượt vào đĩa 96 lỗ đáy phẳng (Costar®, Corning). Dung dịch gốc chứa albumin huyết thanh bò (BSA) được chuẩn bị ở 100, 200, 400, 600, 1,000, và 1,200 $\mu\text{g/mL}$ và 10 μL /lỗ được đặt theo lần lượt và được thử nghiệm cùng với các mẫu. Chất phản thử hoạt động BCA được chuẩn bị bằng cách trộn 50 phần chất phản ứng A với 1 phần chất phản ứng B và tạo phân phân ước 100 μL vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 30 đến 45 phút để cho phản ứng xảy ra. Hệ số hấp thụ thô được đọc tại A590 nm trên máy đọc vi đĩa (VERSAmax, Molecular Devices) và đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng

dụng phần mềm SOFTmax PRO (Molecular Devices). Nồng độ của các mẫu chưa biết được đánh giá từ đường cong.

Phương pháp điện di trên gel SDS polyacrylamit (SDS-PAGE).

Các mẫu protein được chuẩn bị bằng cách trộn một thể tích thích hợp của dung dịch đệm nạp $2 \times$ SDS và được làm biến tính bằng cách gia nhiệt trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 70°C . Gel SDS-PAGE được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị gel tám kép Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories) như được mô tả bởi Laemmli (6). Gel phân giải chứa 0,275 M Tris-HCl ($\text{pH}=8,8$), 0,1% (trọng lượng/thể tích) SDS, 0,05% (trọng lượng/thể tích) amoni persulphat được điều chế mới, 1% (thể tích/thể tích) TEMED và nằm trong khoảng từ 7,5 đến 12% (trọng lượng/thể tích) acrylamit/bisacrylamit (29:1). Dung dịch được pha thành 5 mL trong MilliQ H_2O , và được để đặc lại trong thời gian ít nhất 30 phút (RTemp) trong khi được phủ bằng butanol bão hòa trong nước. Trước khi đổ gel chồng lên, butanol bão hòa trong nước được đổ vào. Gel chồng có chứa 0,125 M Tris-HCl ($\text{pH}=6,8$), 0,1% (trọng lượng/thể tích) SDS, 0,05% (trọng lượng/thể tích) amoni persulphat được điều chế mới, 0,1% (thể tích/thể tích) TEMED và 4% (trọng lượng/thể tích) acrylamit/bisacrylamit (29:1). Dung dịch được pha đến 2,5 mL trên mỗi gel trong MilliQ H_2O , được đổ lên trên cùng của gel phân giải để làm đặc bằng lược 10 lỗ (Bio-Rad Laboratories) trong thời gian ít nhất 30 phút. Phương pháp điện di được tiến hành trong khoảng 1 giờ hoặc cho đến khi thuốc nhuộm chảy ra khỏi đáy gel (200 V, RTemp) trong bộ đệm chạy $1 \times$ SDS.

Sự dịch chuyển Western

Sau kỹ thuật điện di SDS-PAGE, các đĩa gel được tách một cách cẩn thận, lọc dòng ngang gel chồng và chuyển vào tế bào Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories). “Kẹp chuyển” được lắp ráp như sau: một miếng bọt biển xốp, hai tờ giấy thấm (Whatmann), màng nitroxenluloza, gel, hai miếng giấy thấm nữa và một miếng bọt biển xốp khác và được đưa vào thiết bị chuyển. Bọt biển, màng và giấy thấm đã được làm ướt trước trong đệm điện cực lạnh và cẩn thận để ngăn chặn bất

kỳ bọt khí nào hình thành vì điều này sẽ dẫn đến sự chuyển không nhất quán của các protein. Các protein được chuyển ở 100 V trong thời gian 1 giờ (điện áp không đổi) trong đệm truyền lạnh bằng ở nhiệt độ 4°C với màng nitroxenluloza (Hybond™-C, Amersham Biosciences) gần phía anion hơn, và một túi nước đá và máy khuấy từ được thêm vào.

Kiểm tra màng protein

Sau khi được chuyển, màng được ủ trong 5% (trọng lượng/thể tích) Blotto trong 0,1% (thể tích/thể tích) Tween 20/TBS ở RTemp trong thời gian ít nhất 30 phút bằng cách lắc nhẹ theo quỹ đạo để phong bế các vị trí liên kết không đặc hiệu. Kháng thể sơ cấp được pha loãng trong 5% (trọng lượng/thể tích) BSA như được giới thiệu bởi nhà sản xuất (xem Bảng 13 dưới đây) đến thể tích cuối cùng là 2 mL. Một lớp bao nhựa chứa màng và kháng thể đã được tạo ra và được bịt kín bằng nhiệt, loại bỏ càng nhiều bọt khí càng tốt. Lớp bao được quay trên rôto tùy chỉnh qua đêm (khoảng 16 giờ) ở nhiệt độ 4°C.

Màng được lấy ra khỏi túi, đặt vào khay nhựa có 0,1% (thể tích/thể tích) Tween 20/TBS và được rửa bốn lần ở nhiệt độ phòng bằng cách lắc mạnh theo quỹ đạo trong thời gian 15 phút mỗi lần rửa. Kháng thể thứ cấp thích hợp được tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (HRP) được kiểm tra vào màng bằng cách pha loãng nó 1/1000 trong 5% (trọng lượng/thể tích) Blotto trong 0,1% (thể tích/thể tích) Tween 20/TBS và đặt nó trong một lớp bao nhựa mới được quay ở nhiệt độ phòng trong thời gian 2 giờ.

Phát hiện miễn dịch các protein

Để loại bỏ kháng thể không liên kết hoặc liên kết không đặc hiệu bất kỳ, màng được rửa trong 0,1% (thể tích/thể tích) Tween 20/TBS/ ở nhiệt độ phòng bốn lần, mỗi lần trong thời gian 15 phút. Western Lighting™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences) được sử dụng để tạo ra tín hiệu có thể phát hiện từ các kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng HRP. Chất phản ứng dựa

trên sự phân hủy oxy hóa luminol được xúc tác bởi HRP, dẫn đến sự phát xạ ánh sáng mà có thể được phát hiện 420 nm và có thể được thu giữ trên màng. Thể tích tương đương từ lọ 1 và lọ 2 được trộn ngay trước khi phát hiện. Tổng thể tích bằng 2 mL trên mỗi màng được ứng dụng và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 phút. Cần thận để đảm bảo rằng toàn bộ màng được phơi nhiễm như nhau. Màng được loại bỏ, được làm khô nhanh trên một ít giấy thấm, được đặt giữa hai mảnh của thiết bị bảo vệ tấm polypropylen vào caset màng (Hyperscreen™, Amersham Biosciences) và được phơi nhiễm với mảnh màng (SuperRX, Fujifilm). Sự phơi nhiễm ban đầu là 2 phút được sử dụng để đánh giá thời gian phát hiện tối ưu. Màng được hiện lên trong Kodak Image Station (Kodak).

Bảng 13. Các kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm này là:

Kháng thể	Vật chủ	Tỷ lệ pha loãng được sử dụng	Hãng sản xuất
Kháng pan phospho PKC	Thỏ	1:1000	Cell Signalling
Kháng Phospho-ERK (Thr202/Tyr204)	Thỏ	1:1000	Cell Signalling
Kháng ERK	Thỏ	1:1000	Cell Signalling
Kháng Phospho-MEK1/2(Ser217/221)	Thỏ	1:1000	Cell Signalling
Kháng MEK1/2	Thỏ	1:1000	Cell Signalling
Kháng MMP9	Thỏ	1:1000	Cell Signalling
Được tiếp hợp HRP kháng Ig ở thỏ	Cừu	1:1000	Cell Signalling

Trong thử nghiệm đầu tiên với Hợp chất 1, phân tích Western Blot cho thấy sự hoạt hóa thoáng qua của cả MEK1/2 và ERK1/2 sau thời gian 6 giờ điều trị bằng 10 hoặc 30 ng/mL Hợp chất 1, và sự điều hòa giảm hoạt hóa tiếp theo sau 24 giờ điều trị. Hoạt hóa nhánh MEK / ERK trong con đường MAP Kinaza được biết là có ảnh hưởng đến kiểu hình di trú của nhiều loại tế bào, bao gồm cả nguyên bào sợi. Không có sự khác biệt về các mức MMP9 được phát hiện.

Các mẫu phosphoryl hóa tương tự của phospho-ERK được tìm thấy trên Western Blot trong thử nghiệm thứ hai với nồng độ 30 ng/mL của các Hợp chất 1 và 42 trên các NFF.

Ví dụ 11: Ảnh hưởng của Hợp chất 1 đối với sự biểu hiện gen có liên quan đến quá trình làm lành vết thương

Ảnh hưởng của Hợp chất 1 đối với sự biểu hiện của các gen liên quan đến việc làm lành vết thương đã được nghiên cứu trong hai trường hợp (a) các PBMC ở người và (b) mô đệm trên chuột của các mô ghép khác loài khối u ở người.

Vật liệu và Phương pháp

Tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (các PBMC) được phân lập bởi sự đóng cặn Ficoll-Paque của máu được heparin hóa từ người cho là nam 68 tuổi, và được nuôi cấy trong RPMI-1640 10% FCS. Sau khi điều trị bằng Hợp chất 1 ở 30 ng/mL, lớp đơn được rửa một lần bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và các tế bào được thu bằng nạo vô trùng và được bảo quản dưới dạng pelet ở nhiệt độ -80°C.

Mô đệm trên chuột trong mô ghép khác loài khối u ở người thu được từ chuột trong đó dòng tế bào u hắc sắc tố ở người Sk-Mel-28 được tiêm dưới da vào 2 vị trí trên sườn của mỗi con chuột BALB/c Foxn1nu (2×10^6 tế bào/vị trí) và được để sinh trưởng đến đường kính khoảng 7 mm. Mỗi khối u tiếp đó được tiêm bằng 50 μ L của 20% propylen glycol chứa 30 μ g Hợp chất 1 hoặc với 50 μ L của 20% propylen glycol. Ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm, chuột được làm chết một cách nhẹ nhàng và các khối u được thu lại, lớp phủ da được loại bỏ, và các khối u còn nguyên vẹn được bảo quản ở nhiệt độ -80°C

ARN được chiết từ 30 mg khối u đông lạnh hoặc 1×10^7 tế bào bằng cách sử dụng bộ kit QiagenRNeasyPlus Mini Kit, theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, tiếp đó được định lượng bằng thiết bị NanoDrop và tính nguyên vẹn được xác nhận dựa trên

các gel agarosa biến tính mang gen chỉ thị ADN 1 kb và được nhuộm bằng ethidi bromua.

Phóng đại và đánh dấu ARN.

Khoảng 500 ng ARN không được đánh dấu tổng số được điều chỉnh đến thể tích cuối cùng bằng 11 μL với nước không chứa nucleaza. ARN được ủ với 9 μL hỗn hợp trộn sẵn (master mix) transcriptaza ngược (1 μL mỗi T7 Oligo (dT) Primer, 2 μL dung dịch đệm sợi thứ nhất 10X, 4 μL hỗn hợp dNTP, 1 μL chất ức chế Rnaza và 1 μL ArrayScript) ở nhiệt độ 42°C trong thời gian 2 giờ. Bước này được tiếp theo bước tổng hợp cADN sợi thứ hai mà có liên quan đến sự ủ thêm ở nhiệt độ 16°C trong thời gian 2 giờ với 80 μL hỗn hợp trộn sẵn (master mix) sợi thứ hai (63 μL nước không có nucleaza, 10 μL dung dịch đệm sợi thứ hai 10X, 4 μL hỗn hợp dNTP, 2 μL ADN polymeraza và 1 μL RNaza H). cADN được tinh chế bằng cách lọc qua hộp lọc cADN bằng 250 μL dung dịch đệm liên kết cADN và rửa bằng 500 μL dung dịch đệm rửa có trong bộ kit. cADN đã tinh chế được rửa giải ở nhiệt độ 55°C bằng 20 μL nước không có nucleaza. Mỗi mẫu cADN được ủ bằng 7,5 μL hỗn hợp trộn sẵn (master mix) IVT (2,5 μL dung dịch đệm phản ứng T7 10X, 2,5 μL hỗn hợp enzym T7 và 2,5 μL hỗn hợp biotin-NTP) ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 16 giờ. Làm dừng phản ứng bằng cách bổ sung 75 μL nước không có nucleaza vào mỗi mẫu cARN. ARN phóng đại, đã được biotin hóa được tinh chế bằng cách lọc các mẫu cARN thông qua hộp lọc cARN bằng 350 μL dung dịch đệm liên kết cARN và 250 μL etanol 100% được trộn cùng nhau trước khi nạp lên trên bộ lọc. Hộp lọc cARN có ARN kèm theo tiếp đó được rửa bằng 650 μL dung dịch đệm rửa trước khi rửa giải cARN đã được tinh chế bằng 200 μL nước không có nucleaza ở nhiệt độ 55°C.

Lai BeadChip biểu hiện Illumina (Illumina Expression BeadChip)

Các mẫu cARN được gia nhiệt ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 5 phút và được thu lại bằng cách ly tâm xung động. Sau khi gia nhiệt ở 65 độ trong thời gian 5 phút, khoảng 750 ng mẫu cARN được phân chia đều vào các ống riêng rẽ được bổ sung ~ 5 μL nước không có Rnaza và 10 μL hỗn hợp lai (Hyb Mix). Khoảng 15 μL hỗn hợp

cARN đã chuẩn bị được nạp lên trên BeadChip biểu hiện Illumina (Illumina Expression BeadChip). Các bước lai và rửa tiếp theo được tiến hành theo hướng dẫn của thử nghiệm lai trực tiếp biểu hiện gen toàn bộ hệ gen (Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay Guide) được cung cấp bởi Illumina.

BeadChip biểu hiện HT-12 v4 ở người (Human HT-12 v4 Expression BeadChips) bao gồm nhiều hơn 47.000 sản phẩm phiên mã và các biến thể mỗi nối đã biết trên hệ phiên mã của người. BeadChip biểu hiện Ref-8 v2.0 ở chuột (MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips) bao gồm khoảng 25.600 sản phẩm phiên mã RefSeq (Trình tự tham chiếu) được chú thích tốt, bao gồm hơn 19.000 gen duy nhất.

Phân tích dữ liệu

BeadChip được đọc bởi hệ thống iScan (iScan System), và được chuyển qua GenomeStudio thành GeneSpring GX v12.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Các trị số biểu hiện đã được chuẩn hóa bằng cách sử dụng sự chuẩn hóa lượng tử với các cài đặt mặc định. Các thực thể được lọc dựa trên điểm phát hiện được tính bằng GenomeStudio trong đó $p \leq 0,05$ được xem là có ý nghĩa.

Các thay đổi về sự biểu hiện gen có liên quan đến sự làm lành vết thương được cảm ứng trong các PBMC ở người bằng Hợp chất 1

Các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (các PBMC) có rất nhiều trong các tế bào lympho và các tiền thân của đại thực bào (bạch cầu đơn nhân to) tham gia vào việc sản sinh xytokin và các enzym tái tạo mô có liên quan đến quá trình làm lành vết thương. Bảng 14 liệt kê các thay đổi của sự biểu hiện gen được cảm ứng bởi 30 ng/mL Hợp chất 1 cao hơn >2 lần hoặc thấp hơn >2 lần so với đối chứng, PBMC không được điều trị, và có mối liên hệ đã biết với sự làm lành vết thương. Việc làm lành vết thương là một chuỗi phức tạp, nhiều giai đoạn, trong đó các quy trình như viêm sau đó cần được điều hòa giảm. Do đó, cần lưu ý rằng các gen được thể hiện

trong Bảng 14 minh họa các mức phân tử có liên quan được điều hòa bởi Hợp chất 1 trong quần thể dạng bạch huyết hỗn hợp *in vitro*, mà không xác định thứ tự biểu hiện đặc hiệu mô *in vivo*.

Các gen bao gồm các xytokin tiền viêm (IL-1 α , IL-1 β và IL-6) liên quan đến việc bảo vệ khỏi nhiễm trùng, các xytokin để điều hòa phản ứng viêm (IL-10 và IL-24), các yếu tố tăng trưởng (GM-CSF, CSF1 và HBEGF), và một loạt các chemokin và metalloproteinase gian bào để tái tạo mô (metalloproteinase gian bào được hỗ trợ bằng sự điều hòa giảm TIMP2). Sự điều hòa giảm của THBS1, ức chế sự hình thành mô hạt, cũng là yếu tố tính cực trong quá trình làm lành vết thương. Sự điều hòa tăng của KLF10 sẽ hỗ trợ cho quá trình hình thành mạch và là dấu hiệu của việc cảm ứng TGF- β . Transglutaminase (TGM) làm ổn định các protein bằng cách liên kết chéo chúng và có những tác dụng có lợi khác trong việc làm lành vết thương.

Bảng 14. Các thay đổi về sự biểu hiện gen có liên quan đến việc cải thiện hiệu quả làm lành vết thương được cảm ứng trong các PBMC ở người bằng Hợp chất 1

Gen	Tên gen (<i>Homo sapiens</i>)	Thời gian (giờ)	Thay đổi của sự biểu hiện theo số lần	Hướng điều hòa
IL1 α	Interleukin 1, alpha (IL1 α), mRNA.	24	14,6	Tăng
IL1 β	Interleukin 1, beta (IL1 β), mRNA.	24	15,4	Tăng
IL6	Interleukin 6 (Interferon 2, beta) (IL6), mRNA.	24	33,1	Tăng
IL10	Interleukin 10 (IL10), mRNA.	24	2,1	Tăng
IL24	Interleukin 24 (IL24), sản phẩm phiên mã biến thể 1, mRNA.	24	4,6	Tăng
GM-CSF	Yếu tố kích thích khuẩn lạc GM (GM-CSF), mRNA	4	4,3	Tăng
		24	34,6	Tăng
		96	6	Tăng
CSF1	Yếu tố kích thích khuẩn lạc, sản phẩm phiên mã biến thể 4, mRNA.	24	5,1	Tăng
HBEGF	Yếu tố tăng trưởng giống EGF liên kết Heparin (HBEGF), mRNA.	4	2,7	Tăng
		24	5,1	Tăng

CXCL1	Chemokin (mô-tip C-X-C) phổi từ 1 (CXCL1), mRNA.	24	15,5	Tăng
CXCL2	Chemokin (mô-tip C-X-C) phổi từ 2 (CXCL2), mRNA.	4	3,5	Tăng
		24	73,5	Tăng
CXCL5	Chemokin (mô-tip C-X-C) phổi từ 5 (CXCL5), mRNA.	24	8,1	Tăng
		96	15,1	Tăng
CXCL7	Chemokin (mô-tip C-X-C) phổi từ 7 (CXCL7), mRNA.	24	17,5	Tăng
		96	37,4	Tăng
CXCL13	Chemokin (mô-tip C-X-C) phổi từ 13 (CXCL13), mRNA.	24	2,2	Tăng
		96	23,5	Tăng
CCL1	Chemokin (mô-tip C-C) phổi từ 1 (CCL1), mRNA.	24	39,8	Tăng
		96	42,6	Tăng
CCL3	Chemokin (mô-tip C-C) phổi từ 3 (CCL3), mRNA.	24	56,9	Tăng
CCL7	Chemokin (mô-tip C-C) phổi từ 7 (CCL7), mRNA.	4	9,4	Tăng
		24	54,5	Tăng
		96	4,8	Tăng
CCL3L1	Chemokin (mô-tip C-C) 1 (CCL3L1) giống phổi từ 3, mRNA.	4	5,3	Tăng
		24	72,3	Tăng
		96	4,2	Tăng
MMP1	Metallopeptidaza gian bào 1 (MMP1), mRNA.	4	3,1	Tăng
		24	4,2	Tăng
MMP7	Metallopeptidaza gian bào 7 (MMP7), mRNA.	4	3,5	Tăng
		24	7,4	Tăng
		96	117,3	Tăng
MMP9	Metallopeptidaza gian bào 9 (MMP9), mRNA.	24	-22,9	Giảm
MMP10	Metallopeptidaza gian bào 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA.	4	3,2	Tăng
		24	52	Tăng
MMP19	Metallopeptidaza gian bào 19, sản phẩm phiên mã biến thể 1, mRNA.	4	11,6	Tăng
		24	2,6	Tăng
TIMP2	Chất ức chế TIMP metallopeptidaza 2 (TIMP2), mRNA.	24	-10,9	Giảm

THBS1	Thrombospondin 1 (THBS1), mRNA.	4	-47,8	Giảm
		24	-101,5	Giảm
KLF10	Yếu tố giống Kruppel 10 (KLF10), sản phẩm phiên mã biến thể 1, mRNA.	4	5,9	Tăng
		24	9,3	Tăng
TGM3	Transglutaminaza 3 (TGM3), mRNA.	4	2,3	Tăng
		24	28,4	Tăng
TGM2	Transglutaminaza 2 (TGM2), sản phẩm phiên mã biến thể 1, mRNA.	24	12,2	Tăng
		96	4,4	Tăng
TGM5	Transglutaminaza 5 (TGM5), sản phẩm phiên mã biến thể 2, mRNA.	24	-3,3	Giảm

Các thay đổi của sự biểu hiện gen có liên quan đến sự làm lành vết thương được cảm ứng trong mô đệm trên chuột trong mô ghép khác loài khối u ở người bằng Hợp chất

1

Quá trình làm lành hoàn hảo tại các vị trí khối u trên chuột và vật nuôi trong gia đình, được chứng minh bằng sự phục hồi lông và màu lông cũng như sự hình thành sẹo tối thiểu, là dấu hiệu nổi bật trong việc điều trị bằng Hợp chất 1 bằng cách tiêm trong khối u (Các ví dụ 16 và 17). Các thay đổi về sự biểu hiện gen có liên quan đến sự làm lành vết thương do đó được thử nghiệm trong mô đệm có nguồn gốc từ chuột trong mô ghép khác loài khối u ở người ở các thời điểm đầu sau khi tiêm trong khi khối u vẫn còn nguyên vẹn.

Dữ liệu biểu hiện sử dụng vi dây đặc hiệu gen ở chuột được thực hiện đối với 2-3 mô ghép khác loài SK-Mel-28 ở mỗi cá nhân riêng lẻ được điều trị bằng cách tiêm trong khối u với 30 µg Hợp chất 1, cùng với 3 vị trí chỉ có chất mang, dữ liệu được kết hợp. Chỉ có các gen ở chuột đó mới biểu hiện trong vị trí được điều trị bằng Hợp chất 1 cao hơn >2 lần hoặc thấp hơn >2 lần trong vị trí được tiêm chất mang được thử nghiệm về sự tương quan với quá trình làm lành vết thương.

Bảng 15 liệt kê các gen được lựa chọn theo các tiêu chuẩn nêu trên và với các mối liên hệ đã biết với quá trình làm lành vết thương.

Nhiều gen có các hiệu quả có lợi đã biết để làm lành vết thương được điều hòa tăng ít nhất 2-lần so với Hợp chất 1. Các gen này là các gen có liên quan đến sự co cơ (ACTA1), sự sinh trưởng (EGR1), sự điều biến viêm (CXCL1), keratin để phục hồi các tế bào sừng (krt5, 10, 14, 15, 17, 71, krt14), sự di trú tế bào sừng (Col17a1), sự biệt hóa biểu bì và sự giao tiếp tế bào (Irf1, Tgm2, Itga7).

Một gen có liên quan đến sự làm lành vết thương, Thrombospondin 2 (Thbs2), được điều hòa giảm. Sự điều hòa giảm của gen này có liên quan đến mật độ mạch máu và tăng fibronectin trong giai đoạn đầu của quá trình làm lành vết thương.

Bảng 15. Các thay đổi về sự biểu hiện các gen có liên quan đến việc cải thiện hiệu quả làm lành vết thương được cảm ứng trong mô đệm trên chuột trong mô ghép khác loài khối u ở người bằng Hợp chất 1

Mã gen	Tên gen (<i>Mus musculus</i>)	Thời gian (giờ)	Thay đổi của sự biểu hiện theo số lần	Hướng điều hòa
Acta1	Actin, alpha 1, cơ vân (Acta1), mRNA.	0,5	9,3	Tăng
		4	30,3	Tăng
		8	8,5	Tăng
Egr1	Đáp ứng sinh trưởng sớm 1 (Egr1), mRNA.	4	4,7	Tăng
		8	5,34	Tăng
CXCL1	Chemokin (mô-tip C-X-C) phổi từ 1 (Cxcl1), mRNA.	4	12,1	Tăng
krt14	keratin 14 (Krt14), mRNA.	1	9,4	Tăng
		2	5,6	Tăng
		4	9,7	Tăng
Krt10	keratin 10 (Krt10), mRNA.	1	7	Tăng
		2	2,4	Tăng
		4	8,6	Tăng
		8	2,1	Giảm
Krt17	keratin 17 (Krt17), mRNA.	1	2,9	Tăng

		4	10	Tăng
		8	2	Giảm
Krt15	keratin 15 (Krt15), mRNA.	1	2,3	Tăng
Krt5	keratin 5 (Krt5), mRNA.	1	2,8	Tăng
Krt71	keratin 71 (Krt71), mRNA.	4	3,2	Tăng
Col17a1	colagen, loại XVII, alpha 1 (Col17a1), mRNA.	1	2,7	Tăng
		2	2	Tăng
		4	3,2	Tăng
Krtdap	Sự biệt hóa tế bào sừng có liên quan (Krtdap), mRNA.	1	7	Tăng
		4	3,8	Tăng
Lce1m	lớp bao được sừng hóa muộn 1M (Lce1m), mRNA.	1	4,9	Tăng
Lce1b	lớp bao được sừng hóa muộn 1B (Lce1b), mRNA.	1	4,8	Tăng
Lce1d	lớp bao được sừng hóa muộn 1D (Lce1d), mRNA.	1	3,3	Tăng
Lce1a1	lớp bao được sừng hóa muộn 1A1 (Lce1a1), mRNA.	1	2,7	Tăng
		4	2,8	Tăng
Lce1a2	lớp bao được sừng hóa muộn 1A2 (Lce1a2), mRNA.	1	3	Tăng
Lor	loricrin (Lor), mRNA.	1	11,6	Tăng
		2	2,8	Tăng
Tgm2	Transglutaminaza 2, C polypeptit (Tgm2), mRNA.	0,5	2,67	Tăng
		4	2	Giảm
Thbs2	thrombospondin 2 (Thbs2), mRNA.	0,5	3,98	Giảm
Itga7	integrin alpha 7 (Itga7), mRNA.	1	2,1	Tăng

Ví dụ 12: Ảnh hưởng của các hợp chất đối với sự sản sinh xytokin

Xytokin đặc hiệu đóng vai trò quyết định trong các quá trình làm lành vết thương, và các tác nhân điều biến các chất này có thể hữu ích để điều trị vết thương và/hoặc cải thiện các hiệu quả làm lành thẩm mỹ (ví dụ, giảm sự hình thành sẹo). Các tác dụng của các Hợp chất 1, 2, 5 và 42 đối với sự điều hòa của bốn xytokin (IL-1 β , IL-6, IL-8 và TNF α) được biết là quyết định trong các giai đoạn đầu của quá

trình làm lạnh vết thương được nghiên cứu trong các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (PBMC).

Các PBMC được phân lập bằng sự đóng cặn Ficoll-Paque trong máu được heparin hóa thu được từ cả ở người cho là nam giới 72 tuổi (Người cho 1) và 34 tuổi (Người cho 2). Tất cả các tế bào được nuôi cấy trong 10% FCS, RPMI như được mô tả chi tiết ở trên.

Các PBMC được cấy ở mật độ $1,5 \times 10^5$ tế bào trên mỗi lỗ trong 10% FCS, RPMI. Việc kích thích các tế bào này bằng bốn hợp chất được thực hiện ở bốn nồng độ (0 ng/mL, 3 ng/mL, 30 ng/mL, 300 ng/mL) lặp lại trong thời gian 24 giờ trong tủ ủ được tạo ẩm ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Các mẫu môi trường được lấy từ mỗi lỗ cần thiết và được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Thử nghiệm Cytometric Bead Array (CBA) được sử dụng để đo các kết quả. Các thử nghiệm CBA cung cấp phương pháp để thu giữ chất phân tích hòa tan hoặc tập hợp các chất phân tích bằng cách sử dụng các hạt được phủ kháng thể có cỡ và sự phát huỳnh quang đã biết. Sau đó, việc phát hiện được tiến hành bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang khác để tạo thành phức hợp kẹp. Mỗi mẫu môi trường được kiểm tra sự có mặt của IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 và TNF α hòa tan bằng cách sử dụng bộ kit phát hiện xytokin viêm ở người BD (Becton Dickinson) CBA theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trị số mật độ phát huỳnh quang trung bình từ mỗi mẫu được so sánh với đường chuẩn để xác định các nồng độ xytokin (pg/mL).

Các kết quả của thử nghiệm CBA đối với mỗi hợp chất được thể hiện trong Bảng 16.

Tất cả bốn hợp chất làm tăng đáng kể mức của bốn xytokin (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) được phát hiện trong dịch nổi bề mặt được thử nghiệm từ các PBMC được

điều trị, bằng các xu hướng phù hợp giữa các PBMC từ hai người cho. Các mức xytokin cao nhất thường xuất hiện ở hai nồng độ cao nhất (30 và 300 ng/mL) của các hợp chất.

Bảng 16. Sự sản sinh xytokin từ các PBMC sau khi ủ trong thời gian 24 giờ ở các nồng độ bằng 0, 3, 30 và 300 ng hợp chất/ml đối với các Hợp chất 1, 2, 5 và 42. Các mức xytokin được biểu hiện theo pg/ml $\pm$ độ lệch chuẩn và được thể hiện đối với mỗi người trong số hai người cho

Xytokin	[Hợp chất 1] ng/mL						
	0	3	30	300	0	3	300
TNF α	3,7 $\pm$ 1,1	24,3 $\pm$ 1,4	324,4 $\pm$ 0,0	355,0 $\pm$ 4,3	5,3 $\pm$ 0,5	11,2 $\pm$ 0,3	209,6 $\pm$ 7,5
IL-1 β	0,8 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	11,9 $\pm$ 0,8	39 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,9	43,9 $\pm$ 1,7
IL-6	4,5 $\pm$ 0,8	9,7 $\pm$ 1,2	34,2 $\pm$ 1,1	89,5 $\pm$ 13,8	10,5 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 0,4	12,6 $\pm$ 0,9
IL-8	425 $\pm$ 41	1720 $\pm$ 157	16920 $\pm$ 1198	16419 $\pm$ 40	855 $\pm$ 83	1493 $\pm$ 2	24078 $\pm$ 815
	Người cho 1			Người cho 2			

Xytokin	[Hợp chất 2] ng/mL						
	0	3	30	300	0	3	300
TNF α	3,8 $\pm$ 0,7	31,15 $\pm$ 6,9	314,07 $\pm$ 37,9	330,0 $\pm$ 28,7	26,2 $\pm$ 23,9	27,3 $\pm$ 8,3	211,5 $\pm$ 12,4
IL-1 β	0,9 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 1,2	12,1 $\pm$ 0,4	37,7 $\pm$ 4,6	5,5 $\pm$ 3,2	6,7 $\pm$ 1,5	52,6 $\pm$ 5,0
IL-6	3,8 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,2	38 $\pm$ 3,9	84,1 $\pm$ 3,6	13,7 $\pm$ 4,9	14,9 $\pm$ 1,1	14,5 $\pm$ 3,3
IL-8	430 $\pm$ 66	2099 $\pm$ 585	18229 $\pm$ 2592	16634 $\pm$ 625	4073 $\pm$ 3881	2608 $\pm$ 309	26401 $\pm$ 271
	Người cho 1			Người cho 2			

Xytokin	[Hợp chất 5] ng/mL					
	0	3	30	300	0	300
TNF α	4,3 $\pm$ 0,6	85,8 $\pm$ 8,4	289,9 $\pm$ 18,6	306,4 $\pm$ 9,0	15,4 $\pm$ 4,2	620,9 $\pm$ 66,5
IL-1 β	0,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	15,7 $\pm$ 0,9	44 $\pm$ 1,6	4,6 $\pm$ 0,1	114,9 $\pm$ 2,4
IL-6	3,7 $\pm$ 1,0	12,4 $\pm$ 0,2	33,6 $\pm$ 0,6	77,5 $\pm$ 9,1	9,5 $\pm$ 2,1	51,9 $\pm$ 1,3
IL-8	360 $\pm$ 22	4924 $\pm$ 366	17190 $\pm$ 55	17275 $\pm$ 40	2026 $\pm$ 206	33876 $\pm$ 2532
	Người cho 1			Người cho 2		

Xytokin	[Hợp chất 42] ng/mL					
	0	3	30	300	0	300
TNF α	5,0 $\pm$ 1,0	45,8 $\pm$ 55,2	271,9 $\pm$ 22,4	267,5 $\pm$ 1,9	12,6 $\pm$ 7,7	631,6 $\pm$ 16,9
IL-1 β	2,7 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,6	16,8 $\pm$ 1,2	41,3 $\pm$ 1,2	1,9 $\pm$ 1,3	137,8 $\pm$ 10,9
IL-6	5,1 $\pm$ 2,5	8,1 $\pm$ 6,4	32,1 $\pm$ 6,7	71 $\pm$ 4,6	10,1 $\pm$ 1,7	69,3 $\pm$ 1,8
IL-8	403 $\pm$ 86	3013 $\pm$ 377	16389 $\pm$ 84	17425 $\pm$ 680	1224 $\pm$ 887	32925 $\pm$ 552
	Người cho 1			Người cho 2		

Các ví dụ về hoạt tính *in vivo*

Ví dụ 13: Đáp ứng viêm cấp tính trong da chuột

Đáp ứng viêm cấp tính là giai đoạn quan trọng đầu tiên trong quá trình làm lành vết thương. Các tế bào tiền viêm, bạch cầu trung tính sơ cấp và đại thực bào, di trú vào vị trí và bảo vệ nó khỏi nhiễm trùng và giải phóng xytokin và chemokin có liên quan đến sự khởi đầu và điều biến sự sửa chữa mô tiếp theo.

Chuột đực trụi lông được tiêm dưới da mỗi bên sườn với 50 μ L dung dịch 100 μ g/mL của các Hợp chất 1, 2, 5 và 42 tương ứng trong 20% propylen glycol. Mỗi vị trí ứng đỏ trong thời gian 4 giờ và khoảng 24 giờ, khu vực bị ảnh hưởng được bao phủ bởi đường kính da khoảng 1 cm. Sự chai cứng hình thành trong 6 ngày tiếp theo và đến 14 ngày, vị trí đã hoàn toàn lành lặn với ít sẹo.

Đáp ứng viêm cấp tính được khởi đầu bởi các hợp chất trong da chuột, sau đó là sự phân giải nhanh, phù hợp với các tác động trực tiếp quan sát được của các hợp chất trên các tế bào tiền viêm (Ví dụ 7 và 9) và đối với sự biểu hiện gen và cấu hình xytokin trong các PBMC (Ví dụ 11 và 12). Đáp ứng tiền viêm mạnh mẽ nhưng thoáng qua như vậy thường có liên quan đến các hiệu quả làm lành vết thương *in vivo* tốt.

Ví dụ 14: Chế phẩm gel chứa Hợp chất 1

30 mg hoặc 50 mg Hợp chất 1 (độ tinh khiết >97% bằng HPLC) được hòa tan trong 5 mL rượu isopropyl 99,5% (Biotech Pharmaceuticals) và được để qua đêm. Dung dịch chứa 0,6% Carbomer 940 (Snowdrift Farms) được điều chế dưới dạng chất tạo gel trong 5mL nước vô trùng. Hợp chất 1 cô đặc và 0,6% dung dịch Carbomer 940 tiếp đó được bổ sung cùng nhau trong ống tiêm 20 mL và được trộn kỹ. 20 μ L trietanolamin 100% (Sigma-Aldrich) tiếp đó được bổ sung vào và được trộn nhanh. Gel hợp chất 1 tạo thành tiếp đó được phân tán vào ống tiêm insulin 1 mL riêng rẽ để tạo ra liều lượng chứa 3 mg Hợp chất 1/mL và 5mg Hợp chất 1/mL.

Ví dụ 15: Chế phẩm có thể tiêm chứa Hợp chất 1

20mg Hợp chất 1 (độ tinh khiết >97% bằng HPLC) được hòa tan trong 8 mL 1,2 propandiol (Sigma-Aldrich) trong lọ thủy tinh nắp nháy có dung tích 20 mL và được để qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. 12 mL dung dịch đệm axetat 30 mM ở độ pH=4,2 hoặc nước muối (natri clorua pha tiêm BP 0,9% - AstraZeneca) tiếp đó được bổ sung vào dung dịch và được trộn kỹ. Dung dịch tiếp đó được lọc khử trùng và phân phối thành liều lượng 1 mL với nồng độ 1 mg/mL của Hợp chất 1.

Ví dụ 16: Việc điều trị thú y lâm sàng các vết thương chưa lành và vết thương mà không đáp ứng với các tiêu chuẩn chăm sóc hiện tại

Hợp chất 1 đã được sử dụng để điều trị các vết thương khó lành ở 10 con vật nuôi (tức là được nuôi và được chăm sóc riêng) với mục đích để cải thiện quá trình làm lành vết thương theo ý định thứ hai.

Bảy con chó (*Canis lupus familiaris*) và một con chuột túi leo cây (*Dendrolagus lumholtzii*) với các vết thương chưa lành, mạn tính, không đáp ứng với các tiêu chuẩn chăm sóc thú y hiện hành đối với các chỉ định này đã được các bác sỹ thú y độc lập điều trị bằng Hợp chất 1. Con chuột túi leo cây thứ hai và dơi quạ bốn mắt (*Pteropus conspicillatus*) với vết thương không phù hợp để điều trị ban đầu bằng các tiêu chuẩn chăm sóc hiện hành cũng được điều trị bằng Hợp chất 1. Tất cả các trường hợp được xử lý như các vết thương hở mà không sử dụng gạc hoặc băng bó trong quá trình điều trị bằng Hợp chất 1 và giai đoạn xử lý vết thương tiếp theo. Trừ khi được nêu trong các nghiên cứu điển hình riêng lẻ, không có loại thuốc đồng thời nào được sử dụng trong quá trình điều trị bằng Hợp chất 1.

Ghi chú các trường hợp và việc điều trị đối với mỗi bệnh nhân trong số các bệnh nhân này được tóm tắt dưới đây. Lưu ý rằng việc trả lại những con vật này cho bác sỹ thú y điều trị thường không thường xuyên và hiệu quả làm lành vết thương có thể xảy ra tốt trước các lần đánh giá lại.

Việc điều trị bằng Hợp chất 1 giúp xử lý vết thương hiệu quả với sự hình thành sẹo tối thiểu trong tám trường hợp đã hoàn thành. Việc xử lý vết thương đã tiến triển tốt trong hai nghiên cứu điển hình đang tiến hành được điều trị gần đây nhất (Nghiên cứu điển hình 8 và 10).

Các nghiên cứu điển hình từ 1 đến 8: Vết thương chưa lành

Nghiên cứu điển hình 1: Vết thương sâu trên mặt hoại tử chưa lành, chó núi Bernese 3 tuổi

Ghi chú các trường hợp:

- Vết thương lớn, hình bầu dục trên mặt, dài 7cm x rộng 4cm x sâu đến 2cm ở phía bên tay trái của mõm bệnh nhân.
- Vết thương được đóng vảy với các mảnh chảy mù hoại tử.
- Mô bệnh học: tổn thương hoại tử sâu có liên quan đến vết nhện cắn và đặc trưng bởi sự có mặt của vi khuẩn dạng cầu khuẩn và viêm tấy.
- Vết thương không đáp ứng với các phương thức điều trị vết thương chuẩn bao gồm thuốc kháng sinh (xephalexin, amoxycylav, gentamixin) và các chất chống viêm (macrolon) vượt quá khoảng thời gian 3 tháng.
- Vết thương ngày càng tăng dần về kích thước, gây nhắm mắt và ảnh hưởng đáng kể đến thị lực cũng như phong thái chung của bệnh nhân. Các hạch bạch huyết dưới hàm của bệnh nhân đã trở nên to ra.
- Lựa chọn tiêu chuẩn chăm sóc còn lại dành cho phẫu thuật và tái tạo khuôn mặt tích cực.
- Việc điều trị ban đầu bao gồm 5 lần bôi (tổng cộng 5,3mL) gel của Hợp chất 1 (3 mg/mL) trong khoảng thời gian 14 ngày đầu tiên (hợp chất 1 được áp dụng vào các ngày 1, 2, 6, 10 và 14).
- Sau khi vết thương được xử lý một phần ở 28 ngày, bệnh nhân được điều trị bằng một liều 1 mL Hợp chất 1 (0,5 mg/mL) được tiêm ngay dưới bề mặt tại nhiều vị trí trên khắp vùng vết thương.

- Vào 35 ngày sau khi tiêm Hợp chất 1, vết thương đã chứa đầy mô hạt biệt hóa khỏe mạnh và không có dấu hiệu nhiễm trùng.
- Các thuốc dùng đồng thời trong quá trình điều trị bằng Hợp chất 1 là temgesic và lignocain tại thời điểm điều trị đầu tiên bằng chế phẩm gel, temgesic và tramadol vào thời điểm và vào ngày ngay sau khi điều trị bằng thuốc tiêm (tức là các ngày 28 và 29) và tiếp đó là hỗ trợ điều trị bằng corticosteroid đường uống liều thấp (macrolon) hằng ngày từ ngày thứ 42.
- Vào 76 ngày sau lần điều trị cuối cùng, vết thương đã lành và được lấp đầy với mô bình thường, ít sẹo và lông mọc lại bao phủ hơn 95% diện tích vết thương ban đầu.

Nghiên cứu điển hình 2: Nang bụng bị nhiễm trùng, vớ, Boxer 13 tuổi

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân yếu bị bệnh viêm xương khớp nặng, được xem là có nguy cơ gây mê cao đối với bất kỳ can thiệp phẫu thuật nào.
- Bệnh nhân có u nang bị nhiễm trùng dai dẳng ở mặt sau gần đuôi mà không đáp ứng với việc dẫn lưu và tiêm thuốc kháng sinh (gentamycin, enrofloxacin, noroxilin) thường xuyên vào u nang trong khoảng thời gian 5 tháng.
- Bệnh nhân có u nang vỡ và thân nhiệt tăng cao. Khối u nang được làm sạch để loại bỏ da chết và tiếp đó được rửa bằng nước muối và clohexiden. Bệnh nhân được điều trị bằng thuốc kháng sinh (clindamycin và noroxilin) và thuốc chống viêm (metacam).
- Sau thời gian 5 ngày, vết thương có liên quan đến khối nang vỡ không có dấu hiệu khởi và bị bao quanh bởi tình trạng viêm khu trú đáng kể. Sau đó, vùng phoi nhiễm của vết thương (dài khoảng 5cm x rộng 3 cm x sâu đến 2,5cm) tiếp đó được rửa bằng nước muối và 0,5 mL gel Hợp chất 1 (3 mg/mL) được thoa đều lên vùng vết thương.

- Sau 5 ngày điều trị bằng gel Hợp chất 1, vết thương đã co lại đáng kể chỉ còn dưới 30% diện tích của vết thương ban đầu (kích thước ước tính dài 3cm x rộng 1,5cm x sâu 1cm) và bao gồm các mô hạt khỏe mạnh.
- Sau 30 ngày, vết thương đã liền mô bình thường và hơn 70% lông mọc lại so với vùng vết thương ban đầu.
- Các thuốc dùng đồng thời cho bệnh nhân này trong suốt quá trình điều trị bằng Hợp chất 1 là thuốc chống viêm không steroid (metacam) dạng tiêm tại thời điểm điều trị.

Nghiên cứu điển hình 3: Vết thương rách do nhiễm trùng chưa lành, Chow Chow 11 tuổi

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân có hai vết cắn lớn (mỗi vết dài khoảng 4cm x rộng 1,5cm x sâu 2cm) trên vết thương do đánh chó.
- Vết thương đã được rửa sạch và bệnh nhân được điều trị bằng thuốc kháng sinh (viên nén amoxyclav và thuốc tiêm noroxilin).
- Sau thời gian 8 ngày, vết thương vẫn chưa lành, không liền lại và nhiễm trùng.
- Vết thương được làm sạch và thoa đều 0,4 mL gel Hợp chất 1 (3 mg/mL) lên mỗi vết thương.
- Khoảng 15 ngày sau khi điều trị bằng Hợp chất 1, các vết thương co lại đáng kể dưới 40% kích thước ban đầu, hình thành vảy và không có dấu hiệu nhiễm trùng.
- Vào 46 ngày sau khi điều trị bằng Hợp chất 1, vết thương đã hoàn toàn liền với mô bình thường, không để lại sẹo và lông mọc lại toàn bộ trên vùng vết thương.
- Không có thuốc dùng đồng thời cho bệnh nhân này trong khi điều trị bằng Hợp chất 1.

Nghiên cứu điển hình 4: Vết thương nhiễm trùng chưa lành trên mặt và cổ chân của chó (Boxer 11 tuổi)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân có hai vùng vết thương bị nhiễm trùng và viêm chưa lành, một là ở bên trái mặt và một là ở cổ chân sau bên trái không đáp ứng với đợt kháng sinh kéo dài 8 tuần (xephalexin, doxyxycilin) và corticosteroid (macrolon).
- Một lần điều trị bằng chế phẩm gel 5 mg/mL chứa Hợp chất 1 được áp dụng cho vết thương trên mặt (0,4 mL) và vết thương ở chân (0,6 mL).
- Vết thương trên mặt đáp ứng nhanh chóng với việc điều trị bằng Hợp chất 1 với một vảy nhỏ xuất hiện sau 7 ngày và vết thương liền hoàn toàn, bao gồm cả dấu hiệu về sự mọc lông nhiều trở lại vào 14 ngày sau khi điều trị. Vùng vết thương đã được làm lành hoàn toàn sau 63 ngày sau khi điều trị.
- Vết thương ở chân cũng nhanh chóng đáp ứng với các vảy xuất hiện trong các vùng được khoanh vùng. Vào 14 ngày, vảy đã rụng phần lớn và quan sát thấy các mô hạt bên dưới khỏe mạnh. Vùng vết thương đã hoàn toàn liền lại và có hơn 95% lông che phủ vào 63 ngày sau khi điều trị.
- Thuốc dùng đồng thời cho bệnh nhân này trong khoảng thời gian điều trị bằng Hợp chất 1 là một đợt điều trị liên tục hằng ngày của corticosteroid liều thấp (macrolon) để điều trị hội chứng viêm da dị ứng ở chó.

Nghiên cứu điển hình 5: Vết thương nhiễm trùng chưa lành trên tai của chó (Bull Arab 4 tuổi)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân có vết rách chưa lành do tai nạn săn bắn xuất hiện trên tai trái hơn 6 tuần.
- Ba lần điều trị, mỗi lần 0,1 mL chế phẩm gel 5 mg/mL chứa Hợp chất 1, được bôi lên vùng bị ảnh hưởng cách nhau 8 ngày. Không dùng thuốc đồng thời trong khoảng thời gian điều trị cho bệnh nhân bằng Hợp chất 1.

- Khoảng 41 ngày sau lần điều trị đầu tiên bằng Hợp chất 1, vết thương đã liền lại hoàn toàn. Đánh giá thêm vào thời điểm 152 ngày sau khi điều trị ban đầu cho thấy vết thương đã được xử lý hoàn toàn, sự hình thành sẹo tối thiểu với độ che phủ của lông trên 80% so với vị trí vết thương ban đầu.

Nghiên cứu điển hình 6: Vết thương nhiễm trùng chưa lành trên tai chó (Boxer 11 tuổi)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân có chỗ lở loét (bị nhiễm trùng và sưng tấy) chưa lành ở phần phía trên của tai trái và đã được điều trị trong 10 tuần bằng các quy trình chăm sóc tiêu chuẩn bao gồm việc bôi đều đặn (i) chế phẩm khu trú cho da (Neotopic) kết hợp các thuốc kháng khuẩn (neomycin sulphat), chống viêm (hydrocortison) và chống ngứa (lignocain), và (b) hỗn dịch thương mại (Auracol) có các thành phần chống viêm (prednisolon), kháng nấm (miconazol nitrat) và kháng khuẩn (polymixin B sulphat). Trước khi điều trị, bệnh nhân đang trong giai đoạn điều trị bằng corticosteroid qua đường miệng liều thấp (macrolon) để điều trị hội chứng viêm da dị ứng mạn tính ở chó.
- Sau thời gian 10 tuần thực hiện quy trình chăm sóc tiêu chuẩn, vết thương không có dấu hiệu thuyên giảm.
- Một lần điều trị duy nhất bằng 3 mL chế phẩm gel 5 mg/mL chứa Hợp chất 1 được bôi lên vùng bị ảnh hưởng và trong vòng 15 phút sau khi bôi Hợp chất 1, có thể nhận thấy sự ửng đỏ trên vùng được điều trị.
- Từ 4 ngày sau khi điều trị bằng Hợp chất 1, bệnh nhân được khuyên dùng corticosteroid liều thấp hằng ngày (macrolon) để điều trị chứng viêm da dị ứng nặng. Việc điều trị này liên tục trong toàn bộ khoảng thời gian làm lành và xử lý vết thương.
- Vào 17 ngày sau khi điều trị bằng Hợp chất 1, không thấy có dấu hiệu nhiễm trùng hoặc viêm và vết thương dạng hạt tiến triển tốt ở vị trí được điều trị.
- Vào 83 ngày sau khi điều trị, vết thương đã liền hoàn toàn và lông mọc lại trên 90% diện tích vết thương ban đầu.

- Khoảng 139 ngày sau khi điều trị, không thể xác định được vị trí của vết thương ban đầu, không có dấu hiệu của sự hình thành sẹo và hoặc sự khác biệt về sắc tố da hoặc độ dày rõ rệt trong và quanh vùng được điều trị.

Nghiên cứu điển hình 7: Vết thương nhiễm trùng chưa lành trên tai và mặt của chó (chó săn Jack Russell 8 tuổi)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân có hai vết thương chưa lành ở đầu và gốc tai phải và một vết thương chưa lành ở mõm mà người chủ của nó đã quan sát thấy xuất hiện trong hơn 4 tuần. Căn nguyên có thể là do bị nhiễm trùng bởi vết cắn của nhện hoặc vết cắn của côn trùng khác.
- Hai lần điều trị, mỗi lần bằng 0,1 mL chế phẩm gel 5 mg/mL chứa Hợp chất 1, được bôi lên cả hai vùng bị ảnh hưởng trên tai cách nhau 5 ngày. Một lần điều trị 0,1mL chế phẩm gel 5mg/mL chứa Hợp chất 1 được áp dụng cho thương tổn trên mặt.
- Khoảng 13 ngày sau lần điều trị đầu tiên bằng Hợp chất 1, cả hai vết thương trên tai co lại đáng kể và tạo ra vảy. Khoảng 29 ngày, vết thương đã liền lại hoàn toàn và có lông mọc hoàn toàn
- Vào 16 ngày sau khi điều trị, vết thương trên mõm khỏi hoàn toàn.
- Thuốc dùng đồng thời cho bệnh nhân này là một đợt 5 ngày gồm thuốc kháng sinh amoxicillin và axit clavulanic (amoxycylav) qua đường miệng tại thời điểm điều trị ban đầu.

Nghiên cứu điển hình 8: Vết thương ở xương bị nhiễm trùng trên chân của chuột túi leo cây (Marsupialia, *Dendrolagus lumholtzi*)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân là một con chuột túi leo cây hoang dã bị thương do bị chó tấn công dẫn đến sự trật khớp và viêm tủy xương lacrosacral. Bệnh nhân được điều trị trong thời gian 1 tháng bằng thuốc kháng sinh đường tiêm xeftazidim

(Fortum) và trimethoprim sulphametoxazol (TMS). Trong khi tình trạng viêm đã được giảm bớt, nhưng miếng gạc vi khuẩn cho thấy rằng vẫn có các vi khuẩn Gram âm và *Serratiamarcesens*. Chi bị ảnh hưởng, không chịu được sức nặng.

- Việc điều trị bằng xeftazidim thêm 2 tuần nữa vẫn không cải thiện được tình trạng bệnh và bác sỹ thú y khuyên nên tiên lượng xấu để loại bỏ nhiễm trùng từ xương và có khả năng gây gián đoạn cơ học đáng kể đối với cấu trúc xương, bao gồm cả đáng đi sau này. Miếng gạc vi khuẩn mới được lấy từ mũ xoang chảy trên khuỷu chân sau của động vật và gan bàn chân tại thời điểm mà có thể nhận thấy rằng hỗn hợp các loài vi khuẩn kỵ khí và các loài *Actinomyces* Gram dương, do đó một lần truyền natri iodua (Sodide) chậm qua đường tĩnh mạch (IV) đã được thực hiện.
- Do không đáp ứng với các phương pháp điều trị khác và tiên lượng xấu tổng thể với các tiêu chuẩn chăm sóc này, nên việc điều trị cấp cứu bao gồm 4 lần bôi 5 mg/mL chế phẩm gel chứa Hợp chất 1 đã được bắt đầu 2 tuần sau đó.
- Đối với lần bôi đầu tiên, 0,1 mL gel Hợp chất 1 được bôi lên ba tổn thương trên khuỷu chân sau bên phải (một tổn thương trên khớp mắt cá chân, một tổn thương ở dưới gan bàn chân và một tổn thương nhỏ ở đáy vết thương) và tiêm tĩnh mạch (IV) chậm bắt đầu truyền natri iodua. Trong thời gian 10 phút sau khi bôi gel Hợp chất 1, vùng được điều trị có mũ chảy ra.
- Vào 8 ngày sau lần điều trị đầu tiên, dịch mũ rỉ ra từ 2 trong số 3 vết thương ở chân. Vết thương còn lại (vết thương nhỏ nhất khi lành) đã liền lại và bắt đầu lành. Một phương pháp điều trị tiếp theo gồm 0,15 mL chế phẩm gel 5 mg/mL chứa Hợp chất 1 đã được sử dụng để điều trị từng vết thương trong số hai vết thương hở (một vết thương trên khớp mắt cá chân, vết thương còn lại trên đế của gan bàn chân). Truyền tĩnh mạch (IV) chậm natri iodua cũng được đưa ra.
- 15 ngày sau (23 ngày sau lần điều trị đầu tiên) một vài mL mũ đặc được nặn ra từ vết thương trên gan bàn chân trước khi đưa 0,15 mL của 5 mg/mL chế phẩm gel chứa Hợp chất 1 vào chỗ rò trên vết thương đã nặn ra.

- Một tuần sau, tình trạng nhiễm trùng được cải thiện đáng kể. Một mảnh xương nhỏ đã được lấy ra từ lỗ trên gan bàn chân. Không thấy có dấu hiệu của mũ nhưng có sự rỉ máu. 0,2 mL gel Hợp chất 1 nữa được bôi lên mỗi tổn thương, một phần trên mắt cá chân, phần còn lại bên dưới bàn chân. Truyền tĩnh mạch (IV) chậm natri iodua đã được thực hiện. Chi bây giờ là gánh nặng, nhưng vết thương lành và gan bàn chân vẫn rất chắc chắn khi bị viêm nhiễm và đáng đi của con vật rất thất thường và lệch hẳn về chân sau không bị tổn thương.
- 15 ngày sau, vết thương trên khớp mắt cá chân đã liền hoàn toàn và lông mọc trở lại. Vết thương trên gan bàn chân đã lành đã co lại dưới 50% so với kích thước của nó ở lần khám trước đó và da và mô xung quanh mềm, dẻo và bình thường. Chi bây giờ đã hoàn toàn chịu được trọng lượng và không thấy có sự thất thường trong đáng đi của con vật.
- Ngoài natri iodua dạng tiêm, không có loại thuốc đồng thời nào khác được sử dụng cho bệnh nhân trong khoảng thời gian điều trị bằng Hợp chất 1.

Nghiên cứu điển hình về các vết thương khó lành không phù hợp với các tiêu chuẩn chăm sóc hiện hành

Nghiên cứu điển hình 9: Sự viêm mạch do lây nhiễm trong tai của chuột túi leo cây (Marsupialia, *Dendrolagus lumholtzi*)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân là con vật nhỏ bị thương được tìm thấy trong rừng.
- Bệnh nhân rất yếu, bị mất nước và thiếu máu. Mẫu nước tiểu phát hiện có máu và nhiễm khuẩn, có khả năng bị nhiễm trùng máu. Bệnh nhân được đặt liệu pháp truyền dịch và dùng thuốc chống nôn maropitant xitrat (cerenia) và hai chế phẩm kháng sinh dạng tiêm Tribacterial (trimethoprim, sulfadiazin) và xeftazidim (fortum).
- Sau 9 truyền dịch, tình trạng của bệnh nhân được cải thiện nhưng bị chấn thương ở tai phải và có khả năng bị viêm mạch nhiễm trùng và hoại tử. Không thể phẫu thuật vì nguy cơ gây mê đáng kể do tình trạng của bệnh nhân bị tổn

thương nghiêm trọng. Thay vào đó, việc điều trị bằng chế phẩm gel chứa Hợp chất 1 đã được bắt đầu.

- Ba lần điều trị bằng 0,1 mL của gel Hợp chất 1 nồng độ 5 mg/mL được bôi lên vùng bị ảnh hưởng cách nhau 7 ngày. Thuốc đồng thời duy nhất trong thời gian này là thuốc kháng sinh xephalosporin xeftazidim (fortum).
- Vào 7 ngày sau lần điều trị đầu tiên bằng gel Hợp chất 1, có vảy dính chặt phủ lên bề mặt vết thương. Vảy này được bong ra sau 10 ngày để lộ ra lớp hạt màu hồng, tiến triển tốt.
- Vào thời điểm của lần điều trị thứ ba và lần điều trị cuối cùng vào 14 ngày sau lần điều trị đầu tiên, vùng vết thương đã giảm khoảng 50% và vào 25 ngày mô lành đã xuất hiện trên toàn bộ vùng vết thương.
- Vào 67 ngày, tổn thương đã khỏi hoàn toàn và lông mọc lại toàn bộ trên tai.

Nghiên cứu điển hình 10: Vết thương bị xé rách nghiêm trọng trên đầu của con dơi quạ có vòng quanh mắt (động vật có vú, *Pteropus conspicillatus*)

Ghi chú các trường hợp:

- Bệnh nhân là con dơi quạ 4 tháng tuổi có vết thương sâu trên đầu của con dơi quạ 4 tháng tuổi do vướng vào dây thép gai.
- Theo ý kiến của bác sỹ thú y điều trị, người có kinh nghiệm lâu năm về chấn thương động vật hoang dã (bao gồm dơi quạ), các phương pháp chăm sóc tiêu chuẩn thông thường có khả năng gây ra nhiều vấn đề khiến mắt phải bị mất hình dạng và không thể nhắm lại, hoặc là do sự thành mô sẹo quá mức liên quan đến phẫu thuật hoặc mức độ tạo hạt cần thiết nếu áp dụng việc băng vết thương.
- Hợp chất 1 được bôi lên vết thương theo 3 lần bôi là 0,1 mL chế phẩm gel 5 mg/mL trong khoảng thời gian 28 ngày (Ngày 1, 10 và 28). Không có thuốc hoặc biện pháp can thiệp đồng thời nào khác được sử dụng trong quá trình điều trị.
- Vào 14 ngày sau lần điều trị đầu tiên, mô đã được làm đầy và được tái tạo đáng kể và đến 28 ngày thì mắt có thể nhắm hoàn toàn. Đến 38 ngày, vảy

được phủ toàn bộ vùng lên vết thương và vùng này bắt đầu tróc da sau 49 ngày để lộ lớp hạt tốt.

- Vào 55 ngày sau lần điều trị đầu tiên, mô đã được làm đầy tốt trong toàn bộ vùng vết thương ban đầu và mắt phải đã trở lại vị trí ban đầu. Một lớp hạt khỏe mạnh đã xuất hiện.

Ví dụ 17: Xử lý và hiệu quả thẩm mỹ của các vết thương được tạo ra sau khi hoại tử và bong ra của các khối u tự phát ở vật nuôi trong gia đình được điều trị bằng Hợp chất 1

Dữ liệu lâm sàng thú y về tốc độ xử lý các vết thương hình thành sau khi hoại tử và bong ra của các khối u tự phát đã được điều trị bằng cách tiêm vào trong khối u của Hợp chất 1 (30% chế phẩm 1,2 propandiol ở nồng độ 0,5 hoặc 1,0 mg/mL) trong hai mươi bốn con vật nuôi trong nhà như được tóm tắt trong Bảng 17.

Lưu ý rằng tất cả các vết thương được đưa vào nghiên cứu là vết thương hở và không được dùng băng, gạc, thuốc xức hoặc các thuốc dùng đồng thời trong bất kỳ trường hợp nào.

Bảng 17. Kích thước vết thương và tốc độ xử lý (thời gian liền lại) ở vật nuôi trong gia đình theo sau sự bong ra của các khối u tự phát đã được điều trị bằng chế phẩm dạng tiêm chứa Hợp chất 1

Chó				
Loại kích thước vết thương	Số lượng các trường hợp	Diện tích vết thương trung bình (cm ²)	Độ sâu trung bình của vết thương (mm)	Ngày trung bình từ khi bong ra của khối u đến khi liền vết thương
Từ 0,25 đến 9 cm ²	7	3,6 ± 2,7	6,7 ± 2,8	24 ± 16
Từ 9 đến 50 cm ²	5	30,4 ± 16,1	14,0 ± 5,5	40 ± 15
>50 đến 130 cm ²	3	95,3 ± 35,0	13,3 ± 5,8	62 ± 18

Ngựa				
Loại kích thước vết thương	Số lượng các trường hợp	Diện tích vết thương trung bình (cm ²)	Độ sâu trung bình của vết thương (mm)	Ngày trung bình từ khi bong ra của khối u đến khi liền vết thương
Từ 0,25 đến 9 cm ²	4	2,9 ± 1,4	7,5 ± 2,9	20 ± 12
Từ 9 đến 50 cm ²	2	19,5 ± 14,5	10,0 ± 0	53 ± 22
Mèo				
Loại kích thước vết thương	Số lượng các trường hợp	Diện tích vết thương trung bình (cm ²)	Độ sâu trung bình của vết thương (mm)	Ngày trung bình từ khi bong ra của khối u đến khi liền vết thương
Từ 0,25 đến 12 cm ²	3	4,8 ± 6,3	5,0 ± 4,3	17 ± 10

Dữ liệu từ các trường hợp này cũng cho thấy hiệu quả thẩm mỹ tốt để xử lý vết thương với sẹo tối thiểu và lông mọc lại bình thường ở phần lớn bệnh nhân (Bảng 18). Trong một số ít trường hợp, đã xuất hiện sẹo, trường hợp này thường xảy ra với các vùng da bình thường mỏng (ví dụ, trên các chi của ngựa và chó).

Bảng 18. Đặc điểm mô, da và lông của các vị trí vết thương đã lành ở vật nuôi trong nhà sau khi các khối u tự phát bong ra đã được điều trị bằng chế phẩm dạng tiêm chứa Hợp chất 1

Đặc điểm mô, da và lông của vị trí vết thương sau khi xử lý				
Đặc điểm vị trí vết thương và các dạng kết quả		Số lượng chó	Số lượng ngựa	Số lượng mèo
Sự thiếu hụt mô ở vị trí vết thương ¹	Không hoặc rất ít	15	6	3
	Không đáng kể	0	0	0
	Đáng kể	0	0	0
Sự hình thành sẹo & làm dày da ²	Không hoặc rất ít	13	4	3
	Không đáng kể	1	1	0
	Đáng kể	1	1	0
Sự mọc lông lại trên vùng vết thương ³	Toàn bộ	12	5	2
	Một phần	1	1	1
	Thưa thớt	2	0	0

Thay đổi màu lông	Không	15	3	2
	Có	0	3	1
Sắc tố da	Bình thường	11	3	3
	Loang lổ	1	1	0
	Giảm sắc tố da	3	1	0
	Giảm sắc tố da	0	1	0

¹ Các dạng thiếu hụt mô

Không hoặc rất ít: <5% sự thiếu hụt mô trên vùng vết thương ban đầu

Không đáng kể: từ 5 đến 10% sự thiếu hụt mô trên vùng vết thương ban đầu

Đáng kể: >10% sự thiếu hụt mô trên vùng vết thương ban đầu

² Các dạng hình thành sẹo và làm dày da:

Không hoặc rất ít: Sẹo không rõ ràng bằng mắt hoặc bằng cách sờ

Không đáng kể: Sẹo được khoanh vùng bao phủ < 10% vùng vết thương ban đầu

Đáng kể: sẹo bao phủ >10% vùng vết thương ban đầu

³ Các dạng mọc lông lại trên vùng vết thương

Toàn bộ: lông bao phủ >95% vùng vết thương ban đầu

Một phần: lông bao phủ >50% vùng vết thương ban đầu

Thưa thớt: lông bao phủ <50% vùng vết thương ban đầu

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được chọn từ nhóm gồm:

12-hexanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 5);

12-(3-butenoyl)-13-nonanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 22);

12,13-di-nonoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 41);

12,13-di-hexanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 42);

12,13-di-pentanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 43);

12-hexanoyl-13-[2-(N-metylantraniloyl)]-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 47)

12,13-di-heptanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 49);

12-myristoyl-13-axetyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 50);

12-myristoyl-13(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 51); và

12-hydroxy-13-hexanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 53);

hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm gồm:

12-hexanoyl-13-(2-metylbutanoyl)-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 5);

12-(3-butenoyl)-13-nonanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tigliaen-3-on (hợp chất 22);

12,13-di-nonoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglaen-3-on (hợp chất 41); và

12,13-di-hexanoyl-6,7-epoxy-4,5,9,12,13,20-hexahydroxy-1-tiglaen-3-on (hợp chất 42).

3. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, hoặc muối dược dụng của nó và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dược phẩm này được bào chế để dùng khu trú.

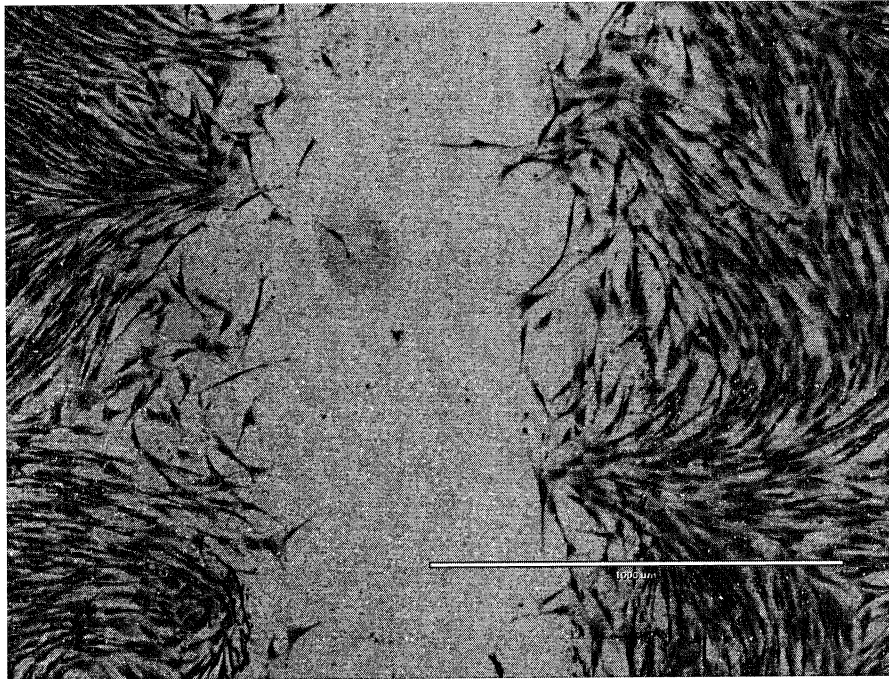


Fig. 1

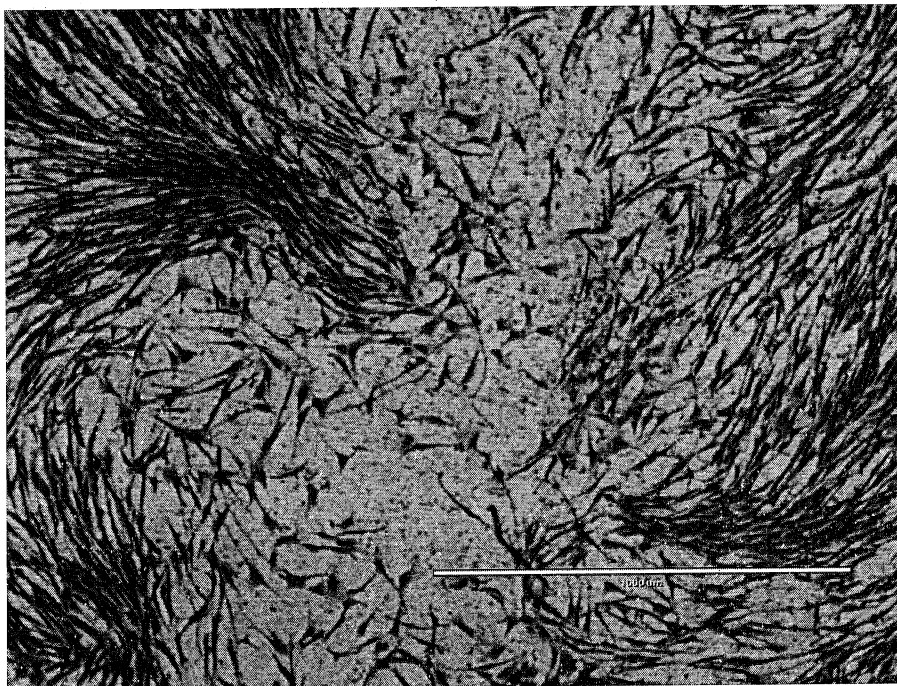


Fig. 2

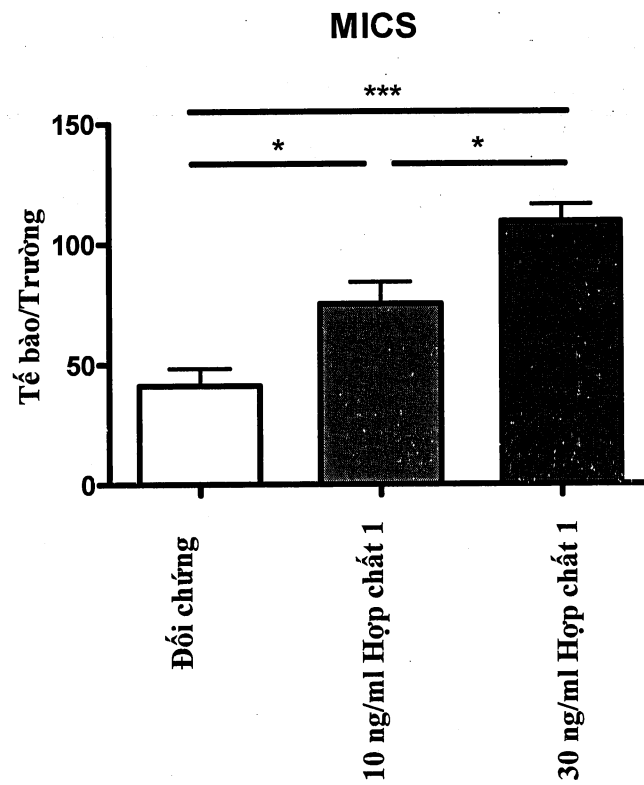


Fig. 3

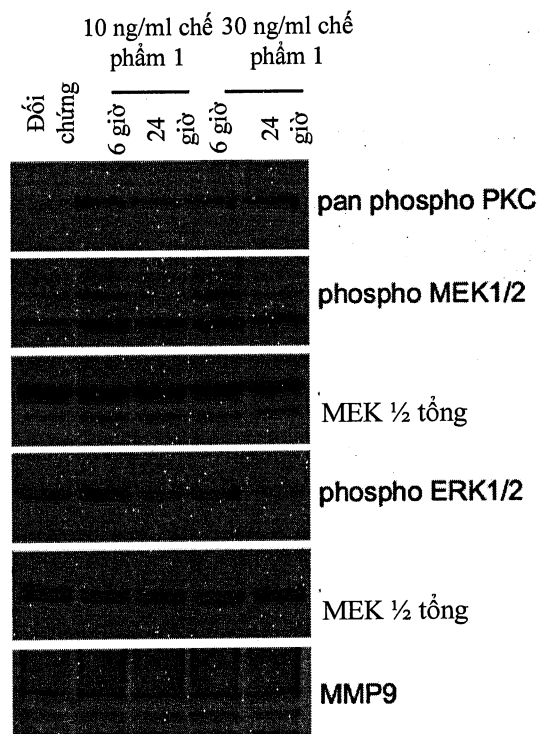


Fig. 4

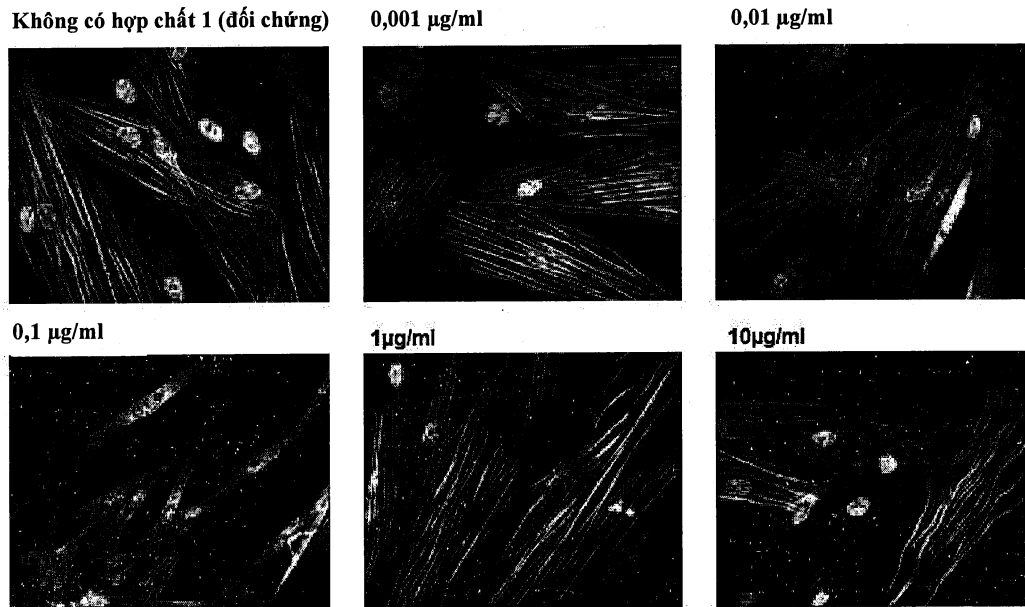


Fig. 5

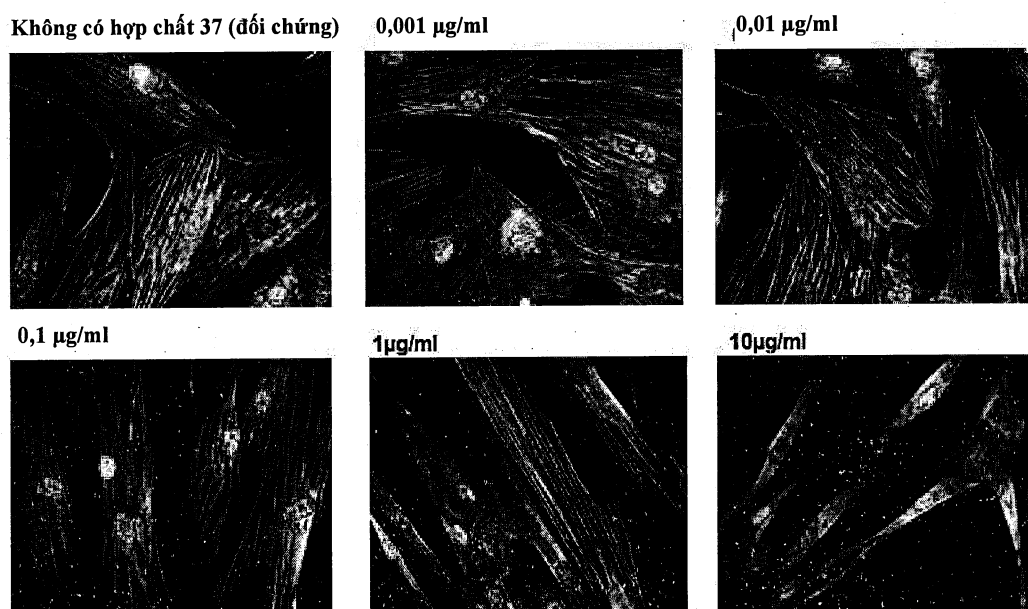


Fig. 6