



(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)



1-0032350

(51)⁷ C07D 487/04; A61P 31/20

(13) B

(21) 1-2018-02400

(22) 02/11/2016

(86) PCT/CN2016/104325 02/11/2016

(87) WO 2017/076286 11/05/2017

(30) 201510742546.9 04/11/2015 CN

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/09/2018 366A

(73) QILU PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

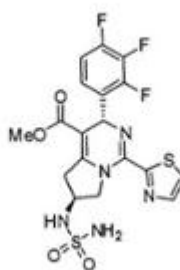
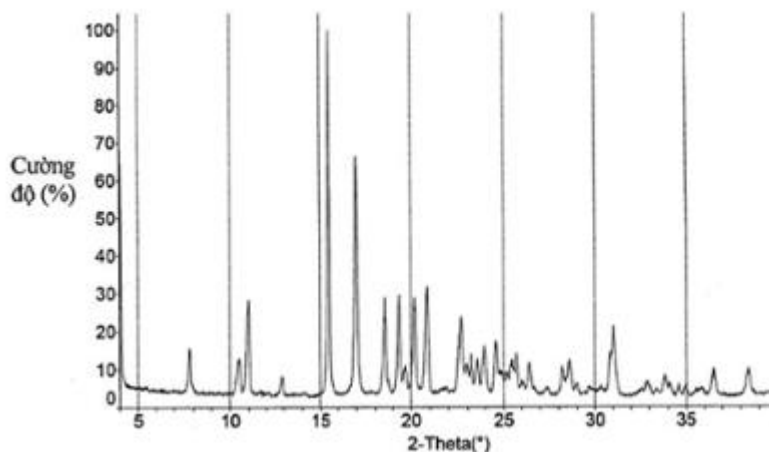
No.317, Xinluo Street, High Technical Zone, Jinan, Shandong 250100, China

(72) HE, Haiying (CN); ZHOU, Kai (CN); LI, Xiaolin (CN); WANG, Xiaofei (CN); QIN, Dakun (CN); WANG, Xingxing (CN); YANG, Feifei (CN); WANG, Zheng (CN); LI, Zongbin (CN).

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

(54) HỢP CHẤT VÒNG DIHYDROPYRIDO Ở DẠNG TINH THỂ, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY VÀ CHẤT TRUNG GIAN CỦA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất vòng dihydropyrido ở dạng tinh thể, phương pháp điều chế hợp chất này và chất trung gian của hợp chất này.



Hợp chất 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

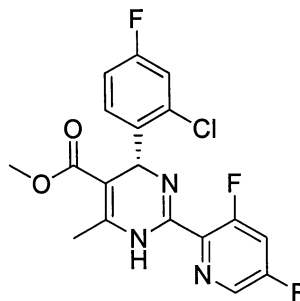
Sáng chế đề cập đến hợp chất vòng dihydropyrido ở dạng tinh thể, phương pháp điều chế hợp chất này và chất trung gian của hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut viêm gan B (Hepatitis B virut - HCV) thuộc họ Hepadnaviridae. Virut này có thể gây bệnh cấp tính và/hoặc mạn tính kéo dài/tiến triển. Virut viêm gan B còn gây ra nhiều biểu hiện lâm sàng khác, đặc biệt là viêm gan mạn tính, bệnh xơ gan và caxinom tế bào gan. Ngoài ra, việc lây nhiễm đồng thời với bệnh viêm gan D có thể có các tác động bất lợi trong sự phát triển của bệnh.

Các chất thông thường đã được cấp phép để điều trị bệnh viêm gan mạn tính là interferon và lamivudin. Tuy nhiên, interferon chỉ có tác động làm giảm nhẹ và có độc tính cao; mặc dù lamivudin có độ hoạt tính tốt, nhưng tính kháng của nó tăng lên nhanh chóng trong khi điều trị và thường có tác động ngược sau khi dừng điều trị. Giá trị IC_{50} của lamivudin (3-TC) là 300 nM (Science, 299 (2003), 893-896).

Deres và các đồng tác giả đã báo cáo về các hợp chất dihydropyrimidin được thế bằng vòng heteroaryl (heteroaryl ring-substituted dihydropyrimidine: HAP) được thể hiện bởi công thức Bay41_4109 và Bay39_5493 mà có thể ức chế sự sao chép HBV bằng cách ngăn sự hình thành nucleocapsid thông thường. Bay41_4109 cho thấy các thông số dược động học tốt hơn trong các nghiên cứu lâm sàng (Science, 299 (2003), 893-896). Các nghiên cứu dựa trên cơ chế hoạt động của hợp chất đã cho thấy các hợp chất dihydropyrimidin được thế bằng vòng heteroaryl làm thay đổi góc giữa các dime tạo thành nucleocapsid (phức hợp gồm axit nucleic và vỏ protein) bằng cách tác động với các gốc axit amin 113-143 của nhân protein, dẫn đến sự hình thành nucleocapsid tương không bền, do đó thúc đẩy sự thoái biến nhân protein (Biochem. Pharmacol. 66 (2003), 2273-2279).



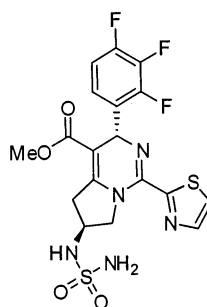
Bay41_4109

Do đó, cần tìm ra các hợp chất mới mà có thể được sử dụng hiệu quả làm thuốc kháng virus, đặc biệt là để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh viêm gan B.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

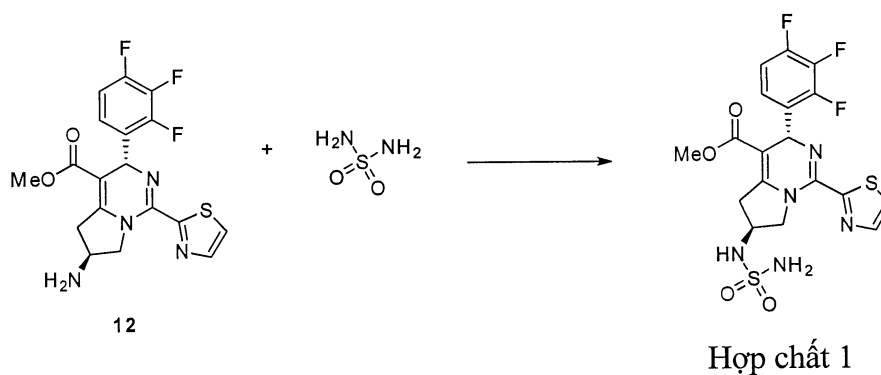
Mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Cụ thể, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế hợp chất 1:



hợp chất 1

bao gồm các bước sau:



trong đó:

bước phản ứng không cần bổ sung bazơ hữu cơ hoặc bazơ vô cơ;

dung môi phản ứng được chọn từ 1,4-dioxan hoặc tetrahydrofuran;

tỷ lệ mol của hợp chất 12 với aminosulfonamid được chọn từ 1:1-20;

nhiệt độ phản ứng được chọn từ 60°C đến nhiệt độ hồi lưu;

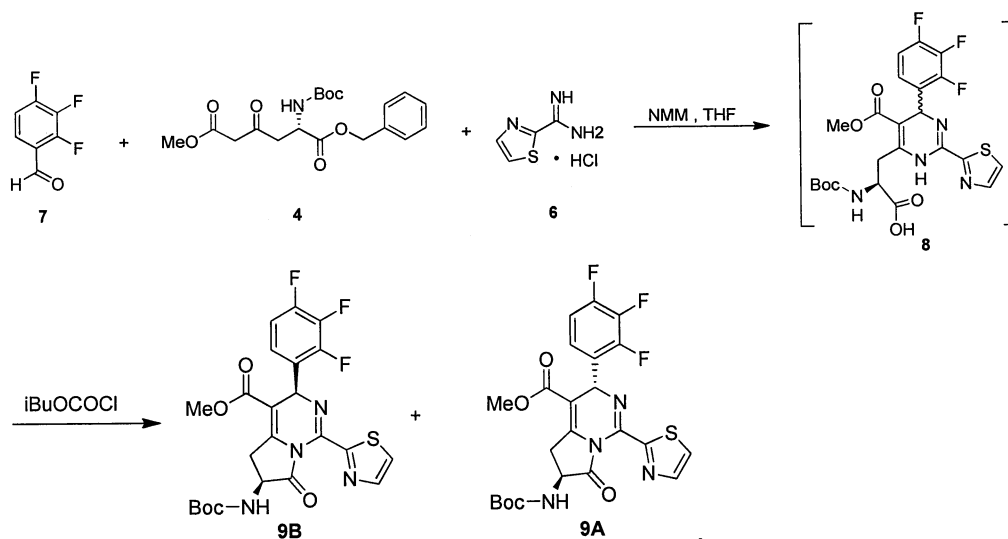
tùy ý, hợp chất 1 được tinh chế bằng cách tái kết tinh trong dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm diclometan, etyl axetat, isopropyl axetat, n-heptan, n-hexan, xyclohexan và ete dầu mỏ.

Theo một số phương án của sáng chế, tỷ lệ mol của hợp chất 12 với aminosulfonamid là 1:10.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 1 được tinh chế bằng cách tái kết tinh trong dung môi hỗn hợp gồm diclometan hoặc etyl axetat/n-heptan.

Theo một số phương án của sáng chế, trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat/n-heptan, tỷ lệ thể tích của etyl axetat với n-heptan là 0,5:1-2.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế nêu trên bao gồm các bước sau:



trong đó,

tỷ lệ mol của NMM với hợp chất 4 là 1-4:1, tốt hơn là 2-3:1;

tùy ý, hợp chất 8 được thêm trực tiếp vào phản ứng tiếp theo mà không cần tách.

Theo một số phương án của sáng chế, hỗn hợp gồm hợp chất 9A và hợp chất 9B tạo

ra bằng cách phản ứng được tách và tinh chế bằng cách tái kết tinh trong dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm etyl axetat, isopropyl axetat, tetrahydrofuran, dioxan, xyclohexan và n-heptan để tạo ra hợp chất 9A.

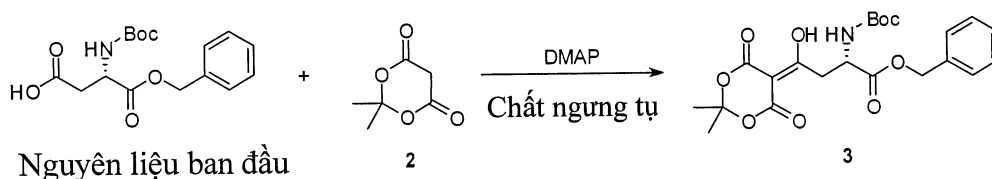
Theo một số phương án của sáng chế, tỷ lệ mol của NMM với hợp chất 4 là 2-3:1.

Theo một số phương án của sáng chế, hỗn hợp gồm hợp chất 9A và hợp chất 9B tạo ra bằng phản ứng được tách và tinh chế phản ứng bằng cách tái kết tinh trong dung môi pha trộn của etyl axetat, tetrahydrofuran và n-heptan để tạo ra hợp chất 9A.

Theo một số phương án của sáng chế, trong dung môi tái kết tinh đối với hỗn hợp gồm hợp chất 9A và hợp chất 9B, tỷ lệ thể tích của n-heptan, etyl axetat và tetrahydrofuran là (6-54):(2-18):1.

Theo một số phương án của sáng chế, tỷ lệ thể tích của n-heptan, etyl axetat và tetrahydrofuran là 18:6:1.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế nêu trên bao gồm các bước sau:



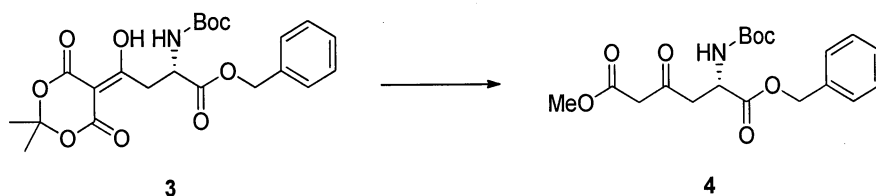
chất ngưng tụ được chọn từ EDCI, DCC, DIC, DMC, HOBT, HATU, CDI;

hiệu độ phản ứng được chọn từ -20°C đến 10°C;

tùy ý, hợp chất 3 được thêm trực tiếp vào phản ứng tiếp theo mà không cần tách.

Theo một số phương án của sáng chế, hiệu độ phản ứng để điều chế hợp chất 3 được chọn từ -10°C đến 0°C.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế nêu trên bao gồm các bước sau:



dung môi phản ứng là dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, t-butanol, tetrahydrofuran, etyl axetat, toluen và xylen.

Theo một số phương án của sáng chế, dung môi phản ứng để điều chế hợp chất 4 là dung môi hỗn hợp gồm toluen và metanol.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh, tạo huyền phù đặc hoặc tái kết tinh trong dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, xyclohexan, n-hexan, n-heptan và ete dầu mỏ.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh, tạo huyền phù đặc hoặc tái kết tinh trong dung môi hỗn hợp được chọn từ nhóm bao gồm etanol/xyclohexan, etanol/n-hexan, etanol/n-heptan hoặc etanol/ete dầu mỏ.

Theo một số phương án của sáng chế, tỷ lệ thể tích của etanol với xyclohexan, n-hexan, n-heptan hoặc ete dầu mỏ được chọn từ 1:1-3.

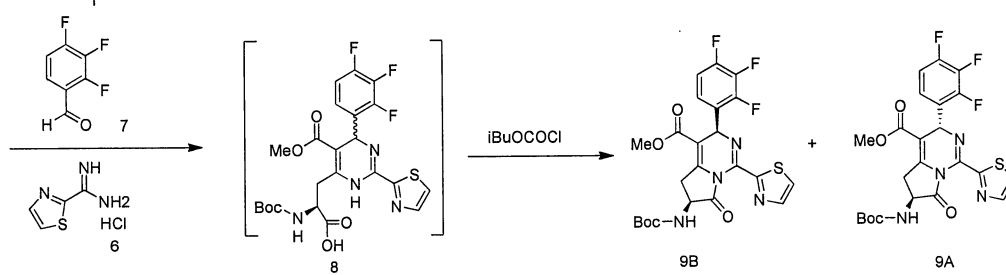
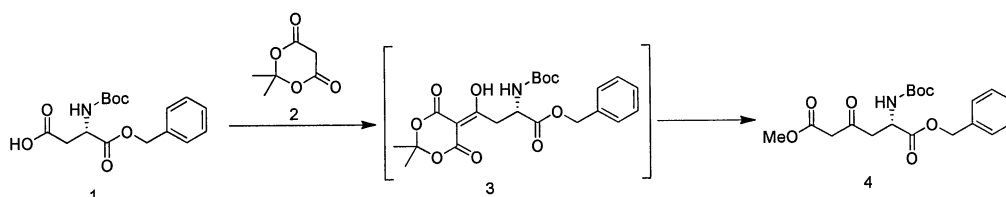
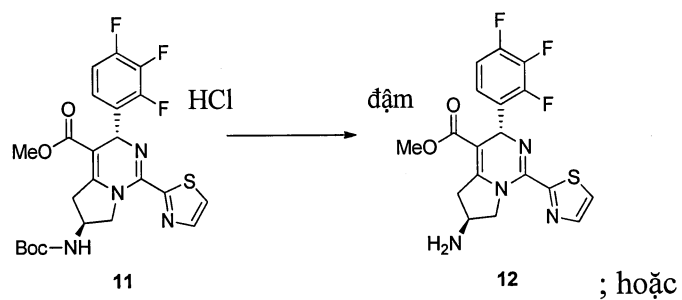
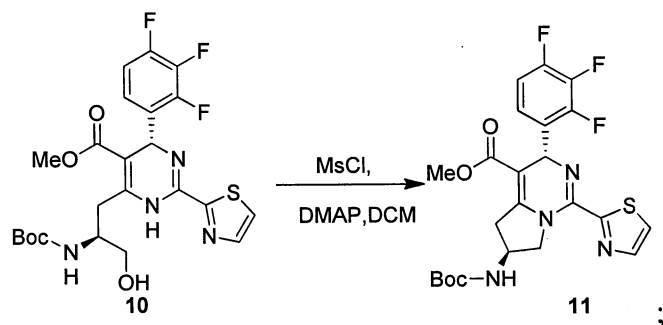
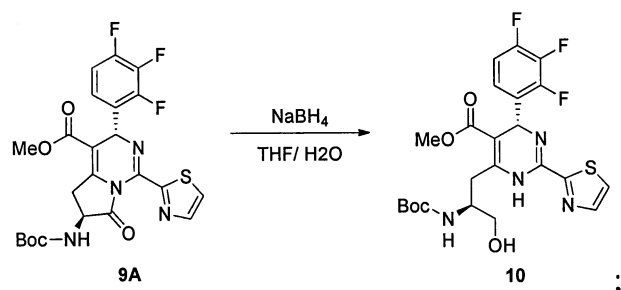
Theo một số phương án của sáng chế, tỷ lệ thể tích của etanol với xyclohexan, n-hexan, n-heptan hoặc ete dầu mỏ được chọn từ 1:1-2.

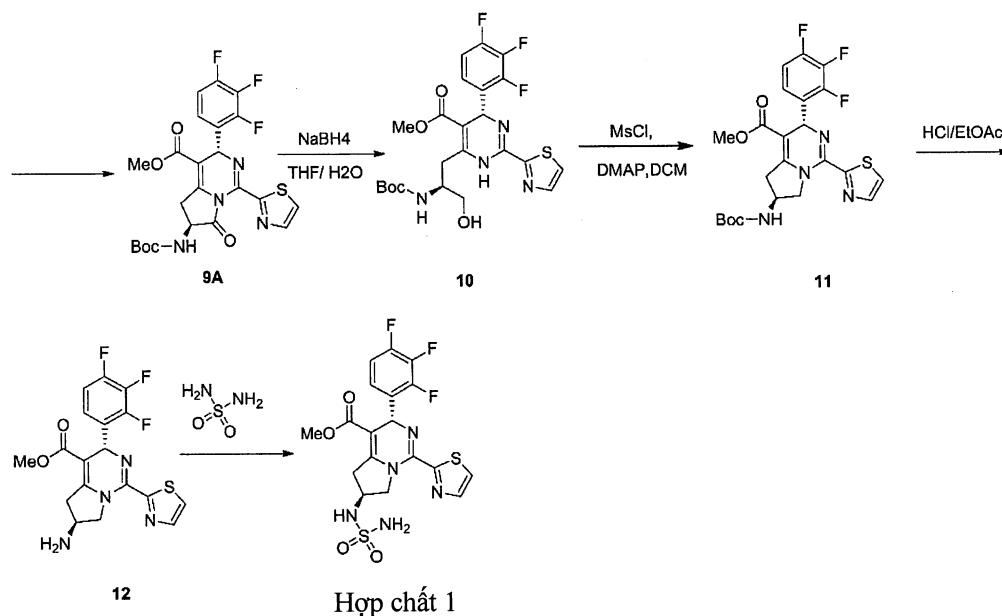
Theo một số phương án của sáng chế, dung môi tinh chế đối với hợp chất 4 là etanol/ete dầu mỏ, và tỷ lệ thể tích của etanol với ete dầu mỏ là 3:5.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh hoặc tạo huyền phù đặc ở nhiệt độ -5°C đến 30°C .

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh hoặc tạo huyền phù đặc ở nhiệt độ 10°C đến 20°C .

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế nêu trên còn bao gồm các bước sau:





Sáng chế đề xuất hợp chất 1 ở dạng tinh thể I, bao gồm mẫu nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các góc 2θ sau: $15,50 \pm 0,2^\circ$, $17,00 \pm 0,2^\circ$, $20,86 \pm 0,2^\circ$.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 1 ở dạng tinh thể I bao gồm mẫu nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các góc 2θ sau: $11,04 \pm 0,2^\circ$, $15,50 \pm 0,2^\circ$, $17,00 \pm 0,2^\circ$, $18,57 \pm 0,2^\circ$, $19,36 \pm 0,2^\circ$, $20,19 \pm 0,2^\circ$, $20,86 \pm 0,2^\circ$, $22,68 \pm 0,2^\circ$.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất 1 ở dạng tinh thể I bao gồm mẫu nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các góc 2θ sau: $7,848^\circ$, $10,489^\circ$, $11,037^\circ$, $12,875^\circ$, $15,497^\circ$, $16,995^\circ$, $18,572^\circ$, $19,360^\circ$, $19,697^\circ$, $20,192^\circ$, $20,861^\circ$, $22,676^\circ$, $22,972^\circ$, $23,225^\circ$, $23,583^\circ$, $23,940^\circ$, $24,571^\circ$, $24,886^\circ$, $25,162^\circ$, $25,476^\circ$, $25,710^\circ$, $26,405^\circ$, $27,393^\circ$, $28,237^\circ$, $28,613^\circ$, $29,007^\circ$, $31,039^\circ$, $32,892^\circ$, $33,858^\circ$, $34,095^\circ$, $34,609^\circ$, $35,000^\circ$, $35,871^\circ$, $36,538^\circ$, $38,433^\circ$.

Sáng chế đề xuất hợp chất 1 ở dạng tinh thể I, bao gồm mẫu XRPD như được thể hiện trên Fig. 1.

Theo một số phương án của sáng chế, số liệu phân tích mẫu XRPD của hợp chất 1 ở dạng tinh thể I được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Số liệu phân tích mẫu XRPD của Fig. 1

Số	2-Theta	I%	Số	2-Theta	I%
1	7,848	12,1	19	25,162	5,0
2	10,489	9,6	20	25,476	5,8
3	11,037	25,4	21	25,710	7,8
4	12,875	5,3	22	26,405	7,2
5	15,497	100,0	23	27,393	1,9
6	16,995	65,0	24	28,237	7,7
7	18,572	26,0	25	28,613	9,4
8	19,360	25,8	26	29,007	2,9
9	19,697	6,2	27	31,039	18,5
10	20,192	24,8	28	32,892	3,6
11	20,861	28,4	29	33,858	5,2
12	22,676	19,0	30	34,095	3,2
13	22,972	5,8	31	34,609	2,9
14	23,225	9,9	32	35,000	2,9
15	23,583	6,6	33	35,871	2,2
16	23,940	10,6	34	36,538	7,1
17	24,571	12,3	35	38,433	7,3
18	24,886	5,0			

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I bao gồm các bước sau: thêm hợp chất 1 vào dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat và ete dầu mỏ để tái kết tinh, trong đó tỷ lệ thể tích của etyl axetat với ete dầu mỏ là 1:0,5-2.

Theo một số phương án của sáng chế, trong phương pháp điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I nêu trên, tỷ lệ thể tích của etyl axetat với ete dầu mỏ là 1:1.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I bao gồm các bước sau: thêm hợp chất 1 vào etyl axetat và gia nhiệt đến nhiệt độ hồi lưu để hòa tan, sau đó thêm từng giọt n-heptan, và làm lạnh dần hỗn hợp đến 10°C xuống -10°C để kết tinh, trong đó tỷ lệ thể tích của etyl axetat với n-heptan là 1:0,5-2.

Theo một số phương án của sáng chế, trong phương pháp điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I nêu trên, tỷ lệ thể tích của etyl axetat với n-heptan là 1:1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là phổ XRPD của bức xạ Cu-K α của hợp chất ở dạng tinh thể I;

Fig. 2 là mẫu DSC của hợp chất ở dạng tinh thể I;

Fig.3 là mẫu TGA của hợp chất ở dạng tinh thể I;

Fig.4 là biểu đồ elip tròn xoay của cấu trúc không gian ba chiều của phân tử đơn của hợp chất 14.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa và mô tả

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ và cụm từ sau được sử dụng ở đây có các nghĩa sau. Cụm từ hoặc thuật ngữ cụ thể không nên hiểu là mập mờ hoặc không rõ ràng khi nó không được xác định cụ thể, mà nên hiểu theo nghĩa thông thường. Tên thương mại xuất hiện trong bài viết là nói đến sản phẩm tương ứng của nó hoặc thành phần hoạt tính của nó.

Các hợp chất trung gian theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp tổng hợp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các phương án cụ thể nêu dưới đây, các phương án này thu được nhờ kết hợp với các phương pháp tổng hợp hóa học khác, và các tương đương đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, các phương án được ưu tiên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các phương án theo sáng chế.

Phản ứng hóa học của các phương án cụ thể theo sáng chế được thực hiện trong dung môi thích hợp mà thích hợp đối với các thay đổi hóa học của sáng chế và các chất phản ứng và các nguyên liệu của chúng. Để thu được các hợp chất theo sáng chế, đôi khi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này cần cải biến hoặc lựa chọn các bước tổng hợp hoặc các sơ đồ phản ứng dựa trên các phương án đã có.

Lưu ý quan trọng trong sơ đồ tổng hợp bất kỳ trong lĩnh vực này là việc lựa chọn nhóm bảo vệ thích hợp đối với nhóm chức phản ứng, như nhóm amino trong sáng chế. Greene and Wuts (Protective Groups In Organic Synthesis, Wiley and Sons, 1991) là tài liệu đáng tin cậy về lĩnh vực này đối với kỹ thuật viên lành nghề. Tất cả các tài liệu trích dẫn ở đây được kết hợp để tham khảo.

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể dưới đây dựa vào phần Ví dụ thực hiện sáng chế, mà không nhằm làm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Tất cả các dung môi sử dụng trong sáng chế có bán ngoài thị trường và có thể được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp. Phản ứng thường được thực hiện trong dung môi khan trong điều kiện khí quyển nitơ trơ. Dữ liệu proton NMR được ghi trên quang phổ kế Bruker Avance III 400 (400 MHz) với độ dịch chuyển hóa học được biểu thị ở dạng (phần triệu – ppm: parts per million) ở vùng tetrametylsilan thấp. Khối phổ được xác định trên máy Agilent 1200 Series Plus 6110 (&1956A). LC/MS hoặc Shimadzu MS bao gồm một DAD: SPD-M20A (LC) và máy dò Shimadzu Micromass 2020. Khối phổ kế được trang bị nguồn ion hóa tia điện (electrospray ionization source - ESI) hoạt động ở trạng thái dương hoặc âm.

Sáng chế chấp nhận các chữ viết tắt sau: DCM là diclometan; PE là ete dầu mỏ; EA là etyl axetat; DMF là N,N-dimetylformamit; DMAC là N,N-dimetylxetamit; DMSO là dimetylsulfoxit; EtOAc là etyl axetat; tol là toluen; THF là tetrahydrofuran; EtOH là etanol; MeOH là metanol; NMP là N-metylpyrrolidon; 2-METHF là 2-metyltetrahydrofuran; i-PrOH là 2-propanol; Bn là benzyl; Cbz là benzyloxycarbonyl, nhóm bảo vệ amin; Boc là t-butylcarbonyl, nhóm bảo vệ amin; Fmoc là carbomethoxycarbonyl, nhóm bảo vệ amin; Alloc là allyloxycarbonyl, nhóm bảo vệ amin; Teoc là trimetylsiloxycarbonyl, nhóm bảo vệ amin; Boc₂O là di-tert-butyl dicarbonat; HCl (g) là khí hydro clorua; H₂SO₄ là axit sulfuric; HOAc là axit axetic; TFA là axit trifloaxetic; DIPEA là diisopropyletylamin; DIEA là diisopropyletylamin; NMM là N-metyl morpholin; DBU là 1,8-diazabicycloundec-7-en; Et₃N là trietylamin; LDA là diisopropylamin lithi; NaHMDS là natri bis (trimetylsilyl) amit; KHMDS là kali bis (trimetylsilyl) amit; LiAlH₄ là lithi nhôm hydrua; t-BuOK là kali tert-butoxit; H₂O₂ là hydro peroxit; NH₄Cl là amoni clorua; BaSO₄ là bari sulfat; CaCO₃ là canxi cacbonat; SnCl₂ là thiếc (II) clorua; Zn (BH₄)₂

là kẽm borohydrua; PPh_3 là triphenylphosphin; HMDS là hexametyldisilazan; Pd/C là paladi trên cacbon; PtO_2 là platin dioxit; Pd(OH)_2 là paladi hydroxit; $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ là tris (dibenzylidenaxeton) dipaladi; $\text{Pd(PPh}_3)_4$ là tetrakis(triphenylphosphin) paladi; Pd(dppf)Cl_2 là 1,1'-bis(diphenylphosphino) ferocendiclopaladi; Pd(OAc)_2 là paladi axetat; PdCl_2 là paladi clorua; CuI là đồng (I) iodua; CuBr là đồng (I) bromua; CuCl là đồng (I) clorua; Cu là bột đồng; Cu_2O là đồng (I) oxit; Xantphos là 4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimetylxanten; Sphos là 2-dixyclohexylphosphino-2',6'-dimetoxybiphenyl; Xphos là 2-dixyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl; Ruphos là 2-dixyclohexylphosphino-2',6'-diisopropoxy-1,1'-biphenyl; Brettphos là 2-(dixyclohexylphosphino)-3,6-dimetoxy-2'-4'-6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl.

Các hợp chất được đặt tên thủ công hoặc bằng phần mềm ChemDraw®, và các hợp chất thương mại sử dụng tên gọi theo nhà cung cấp.

Phương pháp nhiễu xạ kế bột tia X (X-ray powder diffractometer - XRD) theo sáng chế

Mã máy: Nhiễu xạ kế tia X Bruker D8 advance

Điều kiện thử nghiệm: Các thông số XRPD chi tiết như sau:

Máy X quang: Cu, $\text{K}\alpha$, ($\lambda = 1,54056\text{\AA}$).

Điện áp ống: 40kV, Dòng điện ống: 40mA.

Rãnh phóng: 1 độ

Rãnh có chiều cao giới hạn: 10 mm

Rãnh tán xạ: 1 độ

Rãnh tiếp nhận: 0,15 mm

Máy đơn sắc: Máy đơn sắc cố định

Khoảng quét: 4-40 độ

Tốc độ quét: 10 độ/phút

Phương pháp nhiệt lượng quét vi sai (Differential Scanning Calorimeter - DSC) theo sáng chế

Mã máy: Máy đo nhiệt lượng quét vi sai TA Q2000

Điều kiện thử nghiệm: Đặt mẫu (khoảng 1mg) trong bình nhôm DSC, thử nghiệm ở nhiệt độ 25°C đến 350°C với tốc độ tăng nhiệt 10°C/phút.

Phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng (Thermal Gravimetric Analyzer - TGA) theo sáng chế

Mã máy: Máy phân tích nhiệt trọng lượng TA Q5000IR

Điều kiện thử nghiệm: Đặt mẫu (2-5mg) trong bình platin TGA, thử nghiệm ở nhiệt độ trong phòng đến 350°C với tốc độ tăng nhiệt là 10°C/phút.

Ưu điểm kỹ thuật:

Ưu điểm của các phương pháp điều chế hợp chất 1 và chất trung gian của chúng theo sáng chế là như sau: nguyên liệu ban đầu rẻ và dễ tìm; và khắc phục được các nhược điểm như chất phản ứng có lượng lớn độc tính, điều kiện phản ứng khắc nghiệt, khó tách và tinh chế, khó công nghiệp hóa và nhược điểm tương tự.

Đặc biệt:

- 1) Nguyên liệu thô của quy trình theo sáng chế để điều chế hợp chất 1 là các chất phản ứng thông thường hoặc phổ biến mà dễ dàng mua được ngoài thị trường và không đắt;
- 2) Trong quy trình điều chế hợp chất 4, EDCI, DCC, DIC và chất tương tự được sử dụng làm các chất ngưng tụ để tạo ra điều kiện phản ứng dịu nhẹ. Hợp chất thu được 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh hoặc tạo huyền phù đặc với etanol và dung môi cực thấp như ete dầu mỏ hoặc n-heptan, n-hexan hoặc xyclohexan với các thao tác đơn giản và độ tinh khiết của sản phẩm cao;
- 3) Trong quy trình điều chế hợp chất 8, hợp chất 4, hợp chất 6 và hợp chất 7 được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu để tổng hợp hợp chất 8 với các điều kiện phản ứng dịu nhẹ và hiệu suất cao. Hợp chất 8 có thể trực tiếp được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tách, và các thao tác là đơn giản.
- 4) Hỗn hợp gồm hợp chất 9A và hợp chất 9B thu được bằng cách tái kết tinh phản ứng từ dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, tetrahydrofuran và n-heptan. Hợp chất

9A có thể thu được trực tiếp với độ tinh khiết lớn hơn 95% và De lớn hơn 96%.

5) Theo các bước điều chế hợp chất 1, khoảng 10 đương lượng aminosulfonamid và hợp chất 12 được phản ứng trong điều kiện hồi lưu sử dụng dioxan làm dung môi, không thêm bazơ vô cơ hoặc hữu cơ, sản phẩm thu được được làm sạch, và quá trình sau xử lý là dễ dàng và đơn giản.

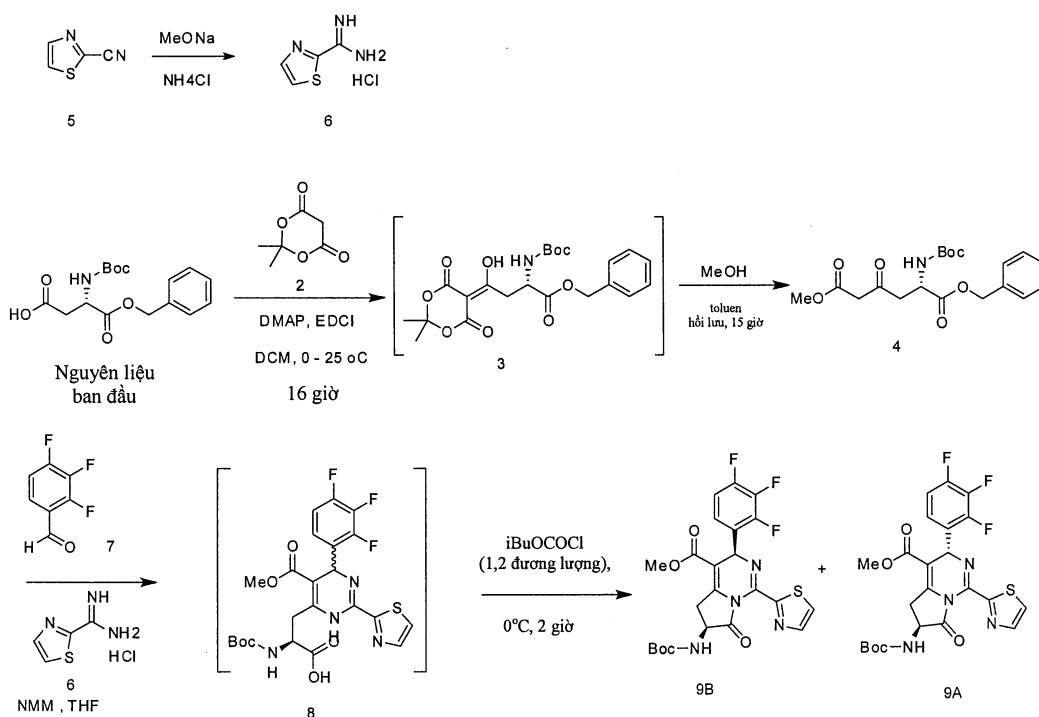
6) Hợp chất 1 ở dạng tinh thể I là hợp chất bền I và có triển vọng dùng cho y tế.

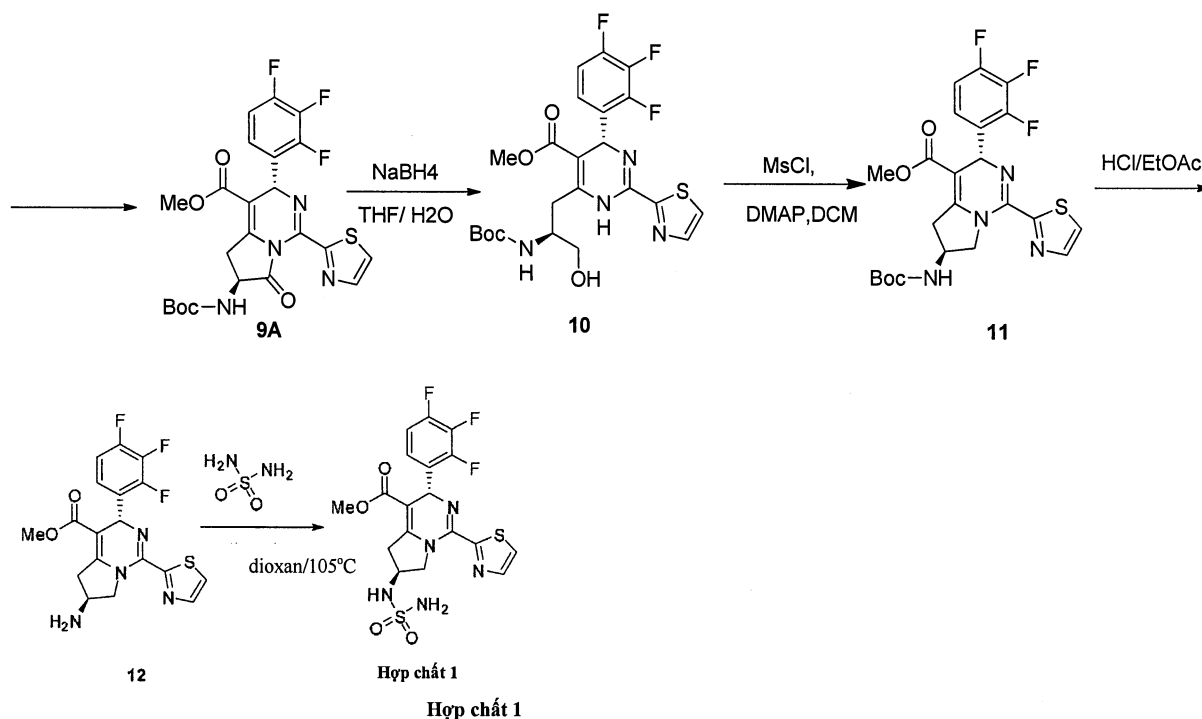
Do đó, quy trình điều chế hợp chất 1 và các chất trung gian của nó theo sáng chế có khả năng áp dụng công nghiệp và có giá trị kinh tế cao.

Để hiểu rõ hơn nội dung của sáng chế, các ví dụ sau nhằm mục đích minh họa sáng chế, nhưng không làm giới hạn sáng chế ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế hợp chất thô 1:





Bước 1: Điều chế hợp chất 4

Thêm DCM (12L) vào nồi phản ứng 50L, và thêm nguyên liệu ban đầu (5,00kg, 15,46mol), và thêm DMAP (2,83kg, 23,20mol), và khuấy hỗn hợp trong 10 phút. Thêm hợp chất 2 (2,23kg, 15,46mol) và làm lạnh nhiệt độ của nồi xuống 0°C. Hòa tan EDCI (4,45kg, 23,20mol) trong DCM (20L) theo mẻ để tạo thành huyền phù, và sau đó thêm chậm từng giọt vào nồi, và nhiệt độ bên trong được điều chỉnh dưới 0°C trong khi nhỏ giọt. Khi hoàn thành việc thêm nhỏ giọt, dung dịch phản ứng được khuấy ở 0°C trong 16 giờ, và sau đó lấy mẫu để dò. Phương pháp dò TLC (PE: EtOAc = 1:1) và LCMS thể hiện sự biến mất của nguyên liệu thô, cho thấy phản ứng đã hoàn thành. Rửa dung dịch phản ứng bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa (20L * 2). Không phát hiện thấy DMAP bằng TLC (PE: EtOAc = 0:1) và xác nhận sự biến mất của DMAP bằng LCMS. Dung dịch phản ứng được rửa bằng dung dịch NaCl bão hòa (15L) một lần, cô đặc trong áp suất giảm và làm khô quay, sau đó thêm toluen (3L) và cô đặc tiếp trong áp suất giảm để tạo ra hợp chất 3. Trọng lượng tách được là 6,95kg, hiệu suất tách là 87,7% và độ tinh khiết là 85%.

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) ppm 1,42 (s, 8 H) 1,65 - 1,76 (m, 5 H) 3,54 - 3,72 (m, 2 H) 4,85 (d, J=6,02 Hz, 1 H) 5,07 - 5,25 (m, 2 H) 5,35 (d, J=8,28 Hz, 1 H) 7,29 - 7,40 (m, 5 H)

LCMS: m/z: 472,1 [M+Na⁺]

Thêm toluen khan (20L) vào nồi phản ứng 50L, và thêm hợp chất 3 (6,95kg, 15,46mol). Trong điều kiện khuấy cơ học, thêm MeOH khan (6,26L, 154,6mol). Dung dịch phản ứng được khuấy trong 16 giờ với nhiệt độ bên trong được điều chỉnh ở 70°C, và sau đó lấy mẫu để dò. Phương pháp dò TLC (PE: EtOAc = 1:1) và LCMS cho biết phản ứng đã hoàn thành. Dung dịch phản ứng được cô đặc trong áp suất giảm để tạo ra chất lỏng nhớt màu nâu hơi đỏ. Sản phẩm thô được hòa tan trong 6L EtOH và 10L ete dầu mỏ. Khuấy dung dịch ở 13°C trong 30 phút và tạo kết tủa rắn màu trắng. Khuấy hỗn hợp trong 2 giờ, để qua đêm và lọc. Rửa chất rắn bằng ete dầu mỏ (5L) trong ba lần và làm khô bằng không khí để tạo ra sản phẩm màu trắng (4,2kg, 11,07mol). Làm lạnh phần lọc đến -11°C và lọc để tạo ra sản phẩm màu trắng (600g, 1,58mol). Tổng trọng lượng tách được là 4,8 kg, hiệu suất tách sau hai bước là 81,7%, và độ tinh khiết là 98%.

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) ppm 1,43 (s, 9 H) 3,07 - 3,16 (m, 1 H) 3,22 - 3,33 (m, 1 H) 3,44 (s, 2 H) 3,72 (s, 3 H) 4,51 - 4,62 (m, 1 H) 5,16 (s, 2 H) 5,48 (d, J=8,03 Hz, 1 H) 7,29 - 7,40 (m, 5 H)

LCMS: m/z: 402,1 [M+Na⁺]

Bước 2: Điều chế hợp chất 6

Thêm MeOH (12L) vào nồi phản ứng 50L, và thêm hợp chất 5 (2200g, 20,00mol, 1 đương lượng), và thêm NaOMe (54g, 1mol, 0,05 đương lượng) và khuấy hỗn hợp ở 10°C trong 0,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lấy mẫu để dò, TLC (PE: EtOAc = 2:1) thể hiện sự biến mất của nguyên liệu thô và tạo ra các chất trung gian. Thêm NH₄Cl (1296g, 24,00mol, 1,2 đương lượng) và khuấy hỗn hợp ở 65°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lấy mẫu để dò, TLC (PE: EtOAc = 2:1) thể hiện sự biến mất của các chất trung gian, cho thấy phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng được lọc để tạo ra NH₄Cl rắn (210g), và phần lọc được làm khô để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tạo huyền phù với EtOAc (20L) trong 2 giờ và lọc để thu được sản phẩm hợp chất 6 (3200g) có độ tinh khiết là 98%. Lượng hiệu quả của NMR được đo bằng Q-NMR là 95%. Hiệu suất tách là 93%.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm 8,26 (d, J=2,76 Hz, 1 H) 8,38 (d, J=3,01 Hz, 1

H) 9,81 (br. s., 1 H)

LCMS: m/z: 127,9 [M+H⁺]

Bước 3: Điều chế hợp chất 9A

Thêm hợp chất 4 (1140g, 3mol) và THF khan (7,5L) vào bình phản ứng hai vỏ dung tích 30L và khuấy. Thêm hợp chất 6 (566g, 3,45mol), hợp chất 7 (502g, 1,1mol) và NMM (760g, 7,5mol). Phản ứng được hồi lưu (60°C) trong 20 giờ. Quan sát lượng axit carboxylic trung gian bằng HPLC và nhiệt độ được làm lạnh xuống 5-10°C. Thêm nhỏ giọt isobutyl cloroformat (492g, 3,6mol, hòa tan trong 500mL THF) và phản ứng ở 5-10°C trong 1 giờ. TLC và HPLC thể hiện axit carboxylic trung gian của phản ứng đã phản ứng hoàn toàn. Dừng phản ứng bằng cách thêm H₂O (3L), và chiết bằng EtOAc (9L), và rửa dung môi hữu cơ một lần bằng H₂O (3L) và cô đặc để tạo ra 2,2kg dịch cái. Hòa tan dịch cái trong EtOAc (3L), thêm THF (500mL), thêm chậm từng giọt n-heptan (khoảng 9L) và khuấy hỗn hợp ở 15°C qua đêm với kết tủa rắn, và lọc để tạo ra chất rắn thô có độ tinh khiết là 95%, De = 85%. Tái kết tinh sản phẩm thô: hòa tan chất rắn trong THF/EtOAc (100g trong 500/500 mL) ở 50°C, thêm nhỏ giọt n-heptan (1L) và khuấy trong 1 giờ, sau đó làm nguội dần đến 25°C và khuấy qua đêm, lọc để tạo ra hợp chất 9A ở dạng chất rắn màu trắng (500g, độ tinh khiết: 96%, De > 96%, hiệu suất: 27%).

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) ppm 1,46 (s, 9 H) 3,11 (dd, J=17,82, 8,03 Hz, 1 H) 3,70 (s, 3 H) 3,86 - 4,03 (m, 1 H) 4,46 (d, J=7,78 Hz, 1 H) 5,30 (d, J=6,27 Hz, 1 H) 6,02 (s, 1 H) 6,89 - 7,00 (m, 1 H) 7,01 - 7,12 (m, 1 H) 7,49 (d, J=3,26 Hz, 1 H) 7,90 (d, J=3,01 Hz, 1 H)

LCMS: m/z: 523,1 [M+H⁺]

Bước 4: Điều chế hợp chất 10

Thêm 200 mL H₂O vào bình phản ứng 10L, và thêm NaBH₄ (39,2g, 1,03mol) vào để hòa tan. Hợp chất 9 (270,0g, 0,52mol) được thêm 4,0L THF để hòa tan ở 0°C, và thêm chậm từng giọt vào bình phản ứng. Hỗn hợp được phản ứng trong 3 giờ với nhiệt độ được điều chỉnh ở 0-5°C. Mẫu dò cho thấy phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng được thêm 750mL HCl (1mol/L) với độ pH được

điều chỉnh đến 7. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được thêm 200mL nước và chiết bằng etyl axetat (500mL * 3). Pha hữu cơ được thu gom, làm khô bằng Na_2SO_4 , và cô đặc để tạo ra 299g sản phẩm thô có độ tinh khiết là 97,23%, hiệu suất tách > 100% (thô), lượng hiệu quả 90% và hiệu suất 96%.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ppm 1,14 (s, 9 H) 2,61 - 2,69 (m, 1 H) 3,38 (br. s., 2 H) 3,52 - 3,59 (m, 4 H) 3,84 - 3,94 (m, 1 H) 4,81 (t, $J=5,65$ Hz, 1 H) 5,86 (s, 1 H) 6,40 (d, $J=9,54$ Hz, 1 H) 7,15 - 7,25 (m, 2 H) 7,94 (d, $J=3,26$ Hz, 1 H) 8,01 (d, $J=3,01$ Hz, 1 H) 9,71 (s, 1 H)

LCMS: m/z : 527,1 $[\text{M}+\text{H}^+]$

Bước 5: Điều chế hợp chất 11

Thêm hợp chất 10 (269,0g, 0,51mol) vào bình phản ứng 5L và thêm 1,2L diclometan vào để hòa tan, sau đó thêm DMAP (187,4g, 1,53mol), và khuấy hỗn hợp trong 10 phút với nhiệt độ bên trong được làm lạnh xuống 0°C . Thêm nhỏ giọt dung dịch metansulfonyl clorua (118,09g, 1,03mol) trong DCM (50mL) với nhiệt độ bên trong được điều chỉnh trong khi thêm nhỏ giọt. Sau khi thêm xong, hỗn hợp được phản ứng trong khi khuấy ở 0°C trong 20 phút, và sau đó ở 35°C trong 16 giờ. Mẫu dò thể hiện phản ứng đã hoàn thành. Thêm 1mol/L HCl (500mL) vào hỗn hợp phản ứng để điều chỉnh độ pH = 2-3. Hỗn hợp phản ứng được thêm 500mL nước và được chiết bằng diclometan (700mL * 3), và pha hữu cơ được thu gom. Hầu như không phát hiện thấy DMAP trong pha hữu cơ, và không phát hiện thấy sản phẩm đích trong pha nước. Sau đó pha hữu cơ được thêm 2mol/L HCl (50mL) và được rửa bằng NaCl bão hòa (500mL * 2). Hầu như không phát hiện thấy DMAP trong pha hữu cơ, và pha nước được chiết bằng diclometan (100mL * 3). Pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng NaHCO_3 1M (300mL * 2), làm khô bằng Na_2SO_4 khan, và cô đặc để tạo ra 270g chất rắn màu vàng (trọng lượng tách 270g, hiệu suất tách 85,7%, độ tinh khiết 88,56%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) ppm 1,38 (s, 9 H) 3,01 (dd, $J=17,82$, 6,27 Hz, 1 H) 3,35 (dd, $J=17,82$, 7,53 Hz, 1 H) 3,53 (s, 3 H) 4,06 - 4,29 (m, 2 H) 4,40 (dd, $J=11,04$, 6,78 Hz, 1 H) 5,89 (s, 1 H) 7,21 - 7,27 (m, 2 H) 7,39 (d, $J=6,02$ Hz, 1 H)

7,89 (d, J=3,26 Hz, 1 H) 7,96 (d, J=3,26 Hz, 1 H)

LCMS: m/z: 509,2 [M+H⁺]

Bước 6: Điều chế hợp chất 12

Hợp chất 11 (1,1kg, 2,1mol, thành phần trọng lượng: 97,14% trọng lượng), etyl axetat (9,9kg) và axit clohydric đặc (0,87kg) được thêm vào nồi phản ứng 30L. Khuấy hỗn hợp ở 25°C trong 3 giờ, mẫu dò thể hiện phản ứng đã hoàn thành. Thêm 4,4kg nước và hỗn hợp được chiết và tách. Pha etyl axetat được loại bỏ. Pha nước lần lượt được rửa hai lần bằng 6,82kg diclometan, tách và pha diclometan được loại bỏ. Pha nước được thêm tiếp 13,25kg diclometan và 1,19L metanol. Hỗn hợp được khuấy và được làm lạnh xuống 5°C, và khoảng 4,4kg natri hydroxit 3N được thêm dần dần để điều chỉnh độ pH đến 13 (khoảng 20 phút). Hỗn hợp được tách và pha hữu cơ được thu gom. Pha nước được chiết một lần bằng dung môi hỗn hợp gồm 9,71kg diclometan và 0,58kg metanol (10/1). Pha hữu cơ được làm khô để tạo ra 0,85kg sản phẩm thô (thành phần trọng lượng: 94,19%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) ppm 1,84 (br. s., 2 H) 2,84 (dd, J=17,57, 6,02 Hz, 1 H) 3,26 (dd, J=17,57, 6,78 Hz, 1 H) 3,55 (s, 3 H) 3,63 (m, J=6,15 Hz, 1 H) 4,00 (dd, J=10,92, 5,65 Hz, 1 H) 4,29 (dd, J=11,04, 6,27 Hz, 1 H) 5,90 (s, 1 H) 7,14 - 7,31 (m, 2 H) 7,89 (d, J=3,26 Hz, 1 H) 7,97 (d, J=3,26 Hz, 1 H)

LCMS: m/z: 409,1 [M+H⁺]

Bước 7: Điều chế hợp chất 1

Hợp chất 12 (0,82kg, 1,89mol, thành phần trọng lượng: 94,19%), 1,4-dioxan (8,2L) và aminosulfonamit (1,89kg, 2,35mol) lần lượt được thêm vào nồi phản ứng 30L và sục khí nitơ. Hỗn hợp được phản ứng trong điều kiện hồi lưu trong 2 giờ. Mẫu dò thể hiện phản ứng gần như đã hoàn thành. Dung dịch phản ứng được làm khô quay, thêm 4,4kg etyl axetat và rửa bằng 12,3kg nước máy một lần. Pha hữu cơ được thêm 6,5kg diclometan, rửa bằng nước đã khử ion hóa (3 * 12,3kg) trong ba lần và cô đặc đến khô để tạo ra hợp chất thô 1.

Ví dụ 2: Điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I

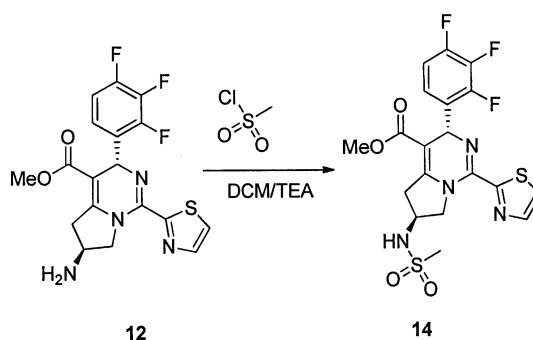
Sản phẩm thô của Ví dụ 1 được hòa tan với 4,76kg diclometan trong điều

kiện hồi lưu. Dung dịch được làm lạnh theo chương trình đến -30°C ở tốc độ $10^{\circ}\text{C}/0,5$ giờ, và giữ ở -20°C trong 60 giờ. Lượng lớn chất rắn được kết tủa và lọc, và dung dịch thu được được nghiền với 2,87kg diclometan, và lọc để tạo ra 790g chất rắn. Chất rắn được hòa tan hoàn toàn trong 1,58L etyl axetat trong điều kiện hồi lưu, sau đó thêm nhỏ giọt 1,58L n-heptan vào, làm nguội xuống 500°C và khuấy cho đến khi xuất hiện lượng lớn chất rắn, sau đó làm nguội theo chương trình (đến -10°C trong 100 phút) và giữ ở -10°C trong 10 giờ. Hỗn hợp được lọc, và dung dịch thu được được rửa bằng dung môi hỗn hợp gồm 0,79L etyl axetat và 0,79L n-heptan, và làm khô trong lò chân không để tạo ra 0,61kg hợp chất 1 ở dạng tinh thể I có độ tinh khiết là 98,5%.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) ppm 3,07 (dd, $J=17,69$, 6,90 Hz, 1 H) 3,48 (dd, $J=17,82$, 7,53 Hz, 1 H) 3,55 (s, 3 H) 4,10 (m, $J=6,88$ Hz, 1 H) 4,20 (dd, $J=11,29$, 6,27 Hz, 1 H) 4,51 (dd, $J=11,29$, 6,78 Hz, 1 H) 5,91 (s, 1 H) 6,76 (s, 2 H) 7,17 (d, $J=7,28$ Hz, 1 H) 7,22 - 7,29 (m, 2 H) 7,89 (d, $J=3,26$ Hz, 1 H) 7,98 (d, $J=3,26$ Hz, 1 H)

LCMS: m/z : 488,1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Phân tích phương pháp phát hiện tia X: Không dễ để phát triển tinh thể đơn trên hợp chất 1. Để xác nhận cấu hình tuyệt đối của hợp chất 1, hợp chất 12 được phản ứng với metansulfonyl clorua để tạo ra hợp chất 14, và tinh thể đơn được phát triển trên hợp chất 14, sơ đồ như sau,



Phản ứng thế xảy ra tại N, và tính bazơ của TEA sử dụng là yếu. Không có sự đảo lộn trong cấu hình của hai cacbon bất đối trong hợp chất 12. Do đó, cấu hình của hai cacbon bất đối trong hợp chất 1 phù hợp với cấu hình của hai cacbon bất đối trong hợp chất 14. Cấu hình tuyệt đối của hợp chất 1 cũng có thể được xác định từ

số liệu tinh thể đơn của hợp chất 14. Tia X của hợp chất 14 được thể hiện trên Fig. 4.

Ví dụ 3: Điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I

Sản phẩm thô của hợp chất 1 thu được trong Ví dụ 1 được tinh chế bằng cột silica gel. Pha động là diclometan/metanol = 100: 1. Sản phẩm thu được được tinh chế hai lần bằng cách tái kết tinh trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat/ete dầu mỏ (thể tích 1: 1) để tạo ra hợp chất 1 ở dạng tinh thể I.

Thử nghiệm qPCR để kiểm tra HBV in vitro

1. Mục đích thử nghiệm:

Thành phần HBV ADN trong các tế bào HepG2.2.15 được phát hiện bằng thử nghiệm qPCR thời gian thực, và các giá trị EC_{50} của hợp chất được sử dụng làm chất chỉ thị để đánh giá tác dụng ức chế của hợp chất lên HBV.

2. Nguyên liệu thí nghiệm:

2.1. Dòng tế bào: Các tế bào HepG2.2.15

Môi trường nuôi cấy tế bào HepG2.2.15 (DMEM/F12, Invitrogen-11330057; huyết thanh 10%, Invitrogen-10099141; 100 đơn vị/ml penixilin và 10 μ g/ml streptomycin, Invitrogen-15140122; 1% axit amin không thiết yếu, Invitrogen-11140076; 2 mM L-GLUTAMIN, Invitrogen-25030081; 300 μ g/ml Genetixin, Invitrogen-10131027.

2.2. Chất phản ứng:

Trypsin (Invitrogen-25300062)

DPBS (Hyclone-SH30028.01B)

DMSO (Sigma-D2650-100ML)

Kit tinh chế ADN năng suất cao (QIAamp 96 DNA Blood Kit, Qiagen-51162)

Chất gốc FastStart Universal Probe định lượng (FastStart Universal Probe Master, Roche-04914058001)

2.3. Nhà cung cấp và thiết bị:

Đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ (Corning-3599)

Máy ủ CO₂ (HERA-CELL-240)

Màng chắn quang (ABI-4311971)

Đĩa định lượng PCR 96 lỗ (Applied Biosystems-4306737)

Dụng cụ PCR định lượng huỳnh quang (hệ PCR thời gian thực Applied Biosystems-7500)

3. Các bước thí nghiệm và phương pháp thí nghiệm:

3.1. Các tế bào HepG2.2.15 (4×10^4 tế bào/lỗ) được gieo trong đĩa 96 lỗ và ủ ở 37°C trong 5% CO₂ qua đêm.

3.2. Vào ngày thứ hai, hợp chất được pha loãng thành tổng cộng 8 nồng độ với sự pha loãng gradien 3 lần. Các nồng độ hợp chất khác nhau được thêm vào các lỗ nuôi cấy, thành hai bản. Nồng độ cuối của DMSO trong môi trường nuôi cấy là 1%. 1µM GLS4 được sử dụng làm đối chứng ức chế 100%; 1% DMSO được sử dụng làm đối chứng ức chế 0%.

3.3. Vào ngày thứ năm, môi trường nuôi cấy mới chứa hợp chất được thay thế.

3.4. Vào ngày thứ tám, môi trường nuôi cấy trong các lỗ nuôi cấy được thu gom và ADN được chiết sử dụng kit tinh chế ADN năng suất cao (Qiagen-51162). Sản phẩm làm thủ công theo quy trình cụ thể.

3.5. Điều chế dung dịch phản ứng PCR được thể hiện trong Bảng 1:

Bảng 1. Điều chế dung dịch phản ứng PCR

Mục	Thể tích cần để điều chế 1 lỗ	Thể tích cần để điều chế 80 lỗ
	(µL)	(µL)
Chất gốc FastStart Universal		
Probe định lượng	12,5	1000
Đoạn mồi ngược (10µmol)	1	80
Đoạn mồi xuôi (10µmol)	1	80
Mẫu dò (10µmol)	0,5	40

Trình tự đoạn môi ngược: GTGTCTGCGGCGTTTTATCA

Trình tự đoạn môi xuôi: GACAAACGGGCAACATACCTT

Trình tự mẫu dò: 5'+ FAM + CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC + TAMRA -3'

3.6. Thêm 15µl hỗn hợp phản ứng vào mỗi lỗ của đĩa PCR 96 lỗ, sau đó là 10µl ADN mẫu hoặc HBV ADN chuẩn vào mỗi lỗ.

3.7. Điều kiện phản ứng PCR: gia nhiệt ở 95°C trong 10 phút; sau đó biến tính ở 95°C trong 15 giây, kéo dài ở 60°C trong 1 phút, tổng là 40 chu kỳ.

3.8. Phân tích số liệu:

3.8.1. Tính phần trăm ức chế: % ức chế = $[1 - (\text{số bản ADN trong mẫu} - \text{số bản ADN trong } 1\mu\text{M GLS4}) / (\text{số bản ADN trong DMSO đối chứng} - \text{số bản ADN trong } 1\mu\text{M GLS4})]$.

3.8.2. Tính EC₅₀: Nồng độ của hợp chất đối với giá trị ức chế 50% (EC₅₀) trên HBV được tính bằng phần mềm GraphPad Prism.

4. Kết quả thí nghiệm

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 3:

Bảng 3. Kết quả kiểm tra EC₅₀ của thử nghiệm qPCR

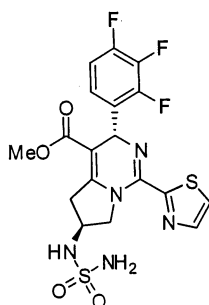
Mẫu	Nồng độ đối với giá trị ức chế 50% (EC ₅₀) trên HBV
Hợp chất 1	A

Xác định hoạt tính sinh học: A: EC₅₀ ≤ 100 nM.

Kết luận: Hợp chất 1 có tác dụng ức chế đáng kể trên HBV ADN.

YÊU CẦU BẢO HỘ

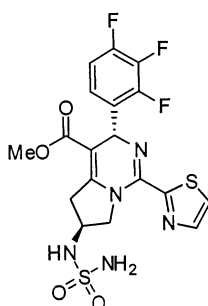
1. Hợp chất 1 ở dạng tinh thể I, bao gồm mẫu nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các góc 2θ sau: $15,50 \pm 0,2^\circ$, $17,00 \pm 0,2^\circ$, $20,86 \pm 0,2^\circ$;



hợp chất 1.

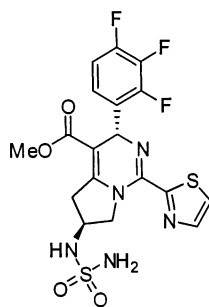
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này còn bao gồm mẫu nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các góc 2θ sau: $11,04 \pm 0,2^\circ$, $15,50 \pm 0,2^\circ$, $17,00 \pm 0,2^\circ$, $18,57 \pm 0,2^\circ$, $19,36 \pm 0,2^\circ$, $20,19 \pm 0,2^\circ$, $20,86 \pm 0,2^\circ$, $22,68 \pm 0,2^\circ$.

3. Hợp chất 1 ở dạng tinh thể I, trong đó hợp chất này còn bao gồm mẫu nhiễu xạ bột tia X có các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng ở các góc 2θ sau: $7,848^\circ$, $10,489^\circ$, $11,037^\circ$, $12,875^\circ$, $15,497^\circ$, $16,995^\circ$, $18,572^\circ$, $19,360^\circ$, $19,697^\circ$, $20,192^\circ$, $20,861^\circ$, $22,676^\circ$, $22,972^\circ$, $23,225^\circ$, $23,583^\circ$, $23,940^\circ$, $24,571^\circ$, $24,886^\circ$, $25,162^\circ$, $25,476^\circ$, $25,710^\circ$, $26,405^\circ$, $27,393^\circ$, $28,237^\circ$, $28,613^\circ$, $29,007^\circ$, $31,039^\circ$, $32,892^\circ$, $33,858^\circ$, $34,095^\circ$, $34,609^\circ$, $35,000^\circ$, $35,871^\circ$, $36,538^\circ$, $38,433^\circ$;



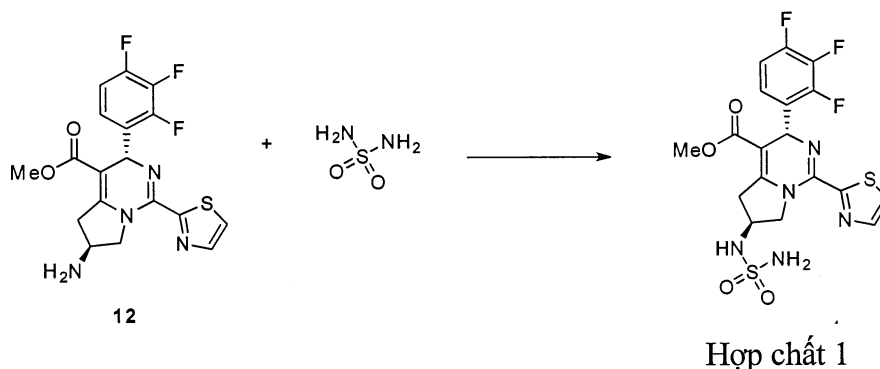
hợp chất 1.

4. Hợp chất 1 ở dạng tinh thể I, trong đó hợp chất này còn bao gồm mẫu XRPD như được thể hiện trên Fig. 1,



hợp chất 1.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hợp chất này còn bao gồm mẫu DSC như được thể hiện trên Fig. 2.
6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hợp chất này còn bao gồm mẫu TGA như được thể hiện trên Fig. 3.
7. Phương pháp điều chế hợp chất 1, phương pháp này bao gồm các bước:



trong đó:

bước phản ứng không cần bổ sung bazơ hữu cơ hoặc bazơ vô cơ;

dung môi phản ứng được chọn từ 1,4-dioxan hoặc tetrahydrofuran;

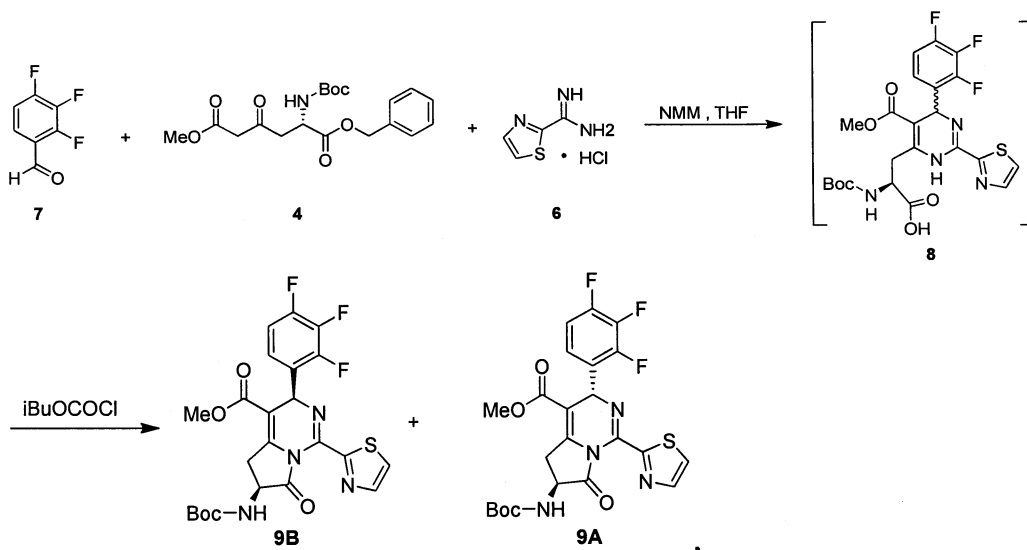
tỷ lệ mol của hợp chất 12 với aminosulfonamid được chọn từ 1:1-20, tốt hơn là 1:10;

nhiệt độ phản ứng được chọn từ 60°C đến nhiệt độ hồi lưu;

tùy ý, hợp chất 1 được tinh chế bằng cách tái kết tinh trong dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm diclometan, etyl axetat, isopropyl axetat, n-heptan, n-hexan, xyclohexan và ete dầu mỏ.

8. Phương pháp điều chế theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm các

bước:



trong đó:

tỷ lệ mol của NMM với hợp chất 4 là 1-4:1, tốt hơn là 2-3:1;

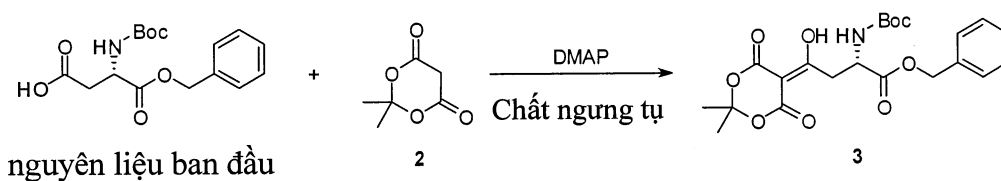
tùy ý, hợp chất 8 được thêm trực tiếp vào phản ứng tiếp theo mà không cần tách;

tùy ý, hỗn hợp gồm hợp chất 9A và hợp chất 9B tạo ra bằng phản ứng được tách và tinh chế bằng cách tái kết tinh trong dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm etyl axetat, isopropyl axetat, tetrahydrofuran, dioxan, xyclohexan và n-heptan để tạo ra hợp chất 9A;

tốt hơn là, dung môi tái kết tinh được chọn từ dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, tetrahydrofuran và n-heptan;

tốt hơn nữa là, tỷ lệ thể tích của n-heptan, etyl axetat và tetrahydrofuran trong dung môi hỗn hợp là (6-54):(2-18):1, và tốt hơn nữa là 18:6:1.

9. Phương pháp điều chế theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:



nguyên liệu ban đầu

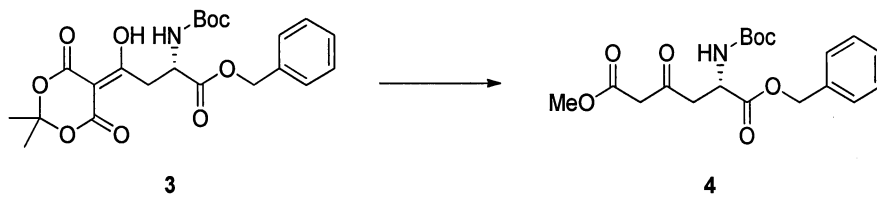
trong đó, chất ngưng tụ được chọn từ EDCI, DCC, DIC, DMC, HOBt, HATU,

CDI;

nhiệt độ phản ứng được chọn từ -20°C đến 10°C , tốt hơn là từ -10°C đến 0°C ;

tùy ý, hợp chất 3 được thêm trực tiếp vào phản ứng tiếp theo mà không cần tách.

10. Phương pháp điều chế theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:



trong đó, dung môi phản ứng là dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, t-butanol, tetrahydrofuran, ethyl axetat, toluen và xylen, tốt hơn là dung môi hỗn hợp gồm toluen và metanol;

tùy ý, hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh, tạo huyền phù đặc hoặc tái kết tinh trong dung môi đơn hoặc dung môi hỗn hợp gồm nhiều dung môi được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, xyclohexan, n-hexan, n-heptan và ete dầu mỏ;

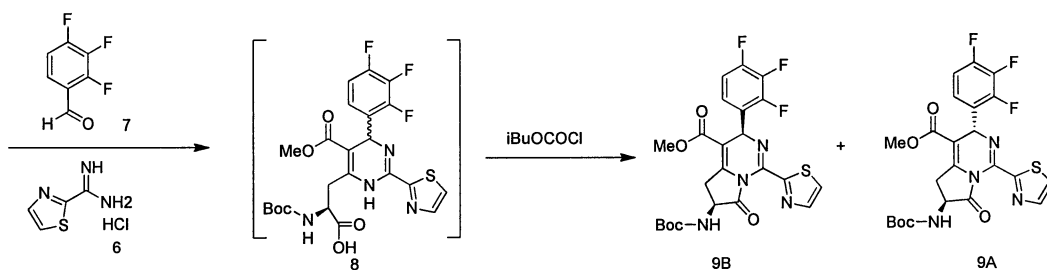
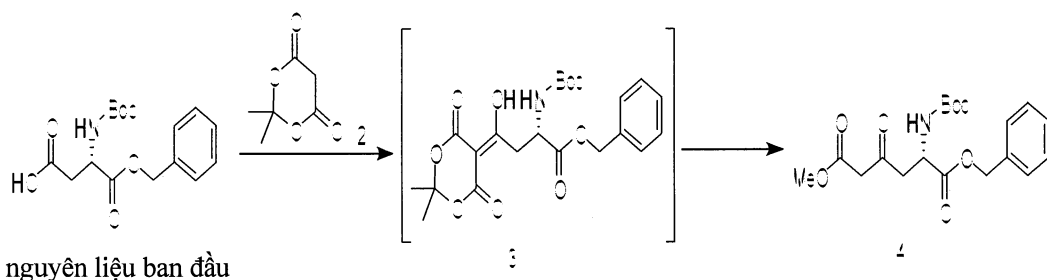
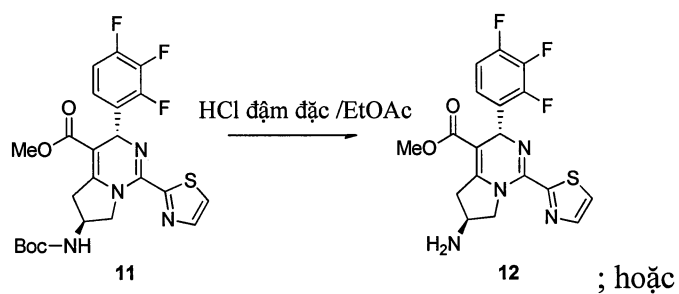
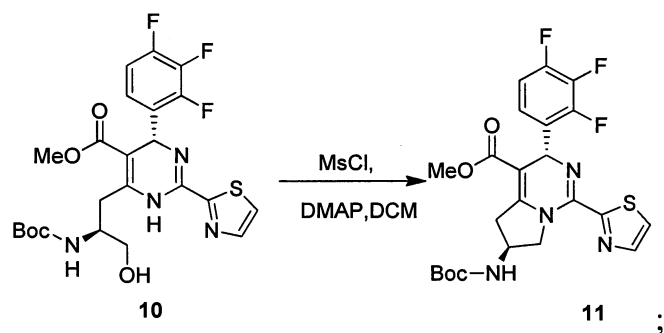
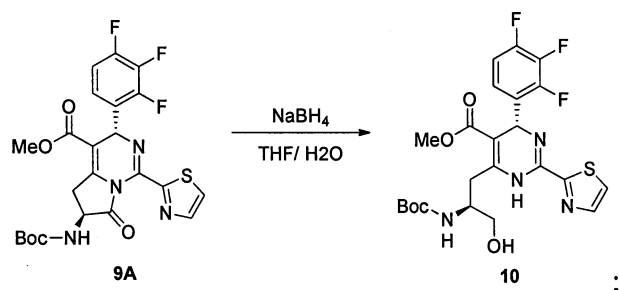
hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh hoặc tạo huyền phù đặc ở nhiệt độ từ -5°C đến 30°C , tốt hơn là từ 10°C đến 20°C ;

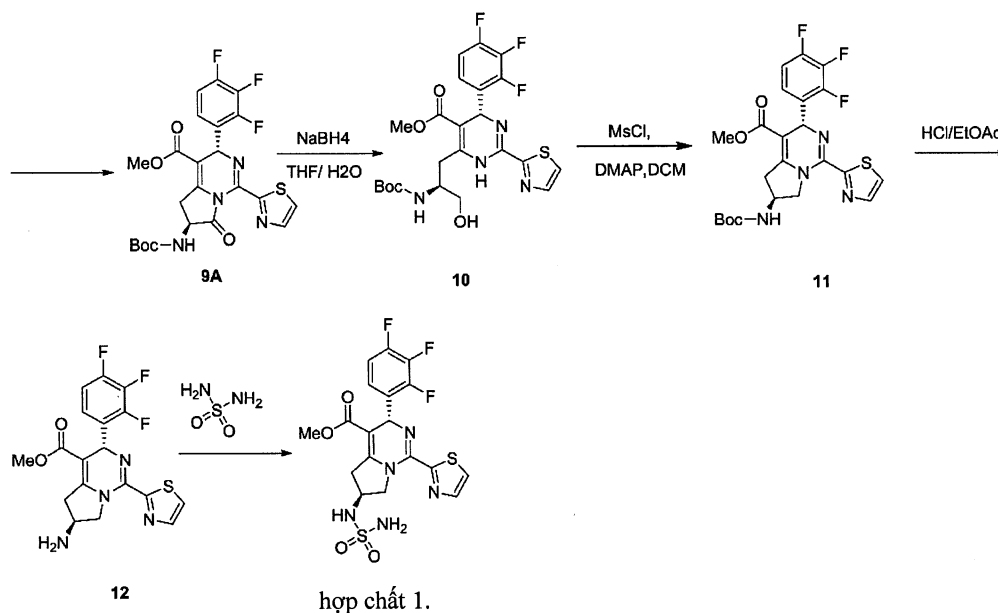
tốt hơn là, hợp chất 4 được tinh chế bằng cách khuấy kết tinh, tạo huyền phù đặc hoặc tái kết tinh trong dung môi hỗn hợp được chọn từ nhóm bao gồm etanol/xyclohexan, etanol/n-hexan, etanol/n-heptan hoặc etanol/ete dầu mỏ;

tốt hơn nữa là, tỷ lệ thể tích của etanol với xyclohexan, n-hexan, n-heptan hoặc ete dầu mỏ trong dung môi hỗn hợp được chọn từ 1:1-3;

tốt hơn nữa là, dung môi hỗn hợp là etanol/ete dầu mỏ, và tỷ lệ thể tích của etanol với ete dầu mỏ là 3:5.

11. Phương pháp điều chế theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:





12. Phương pháp điều chế hợp chất 1 ở dạng tinh thể I theo điểm 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:

thêm hợp chất 1 vào dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat và ete dầu mỏ để tái kết tinh, trong đó tỷ lệ thể tích của etyl axetat với ete dầu mỏ là 1:0,5-2, tốt hơn là 1:1; hoặc

thêm hợp chất 1 vào etyl axetat và gia nhiệt đến hồi lưu để hòa tan, sau đó thêm từng giọt n-heptan, và làm lạnh dần hỗn hợp đến 10°C xuống -10°C để kết tinh, trong đó tỷ lệ thể tích của etyl axetat với n-heptan là 1:0,5-2, tốt hơn là 1:1.

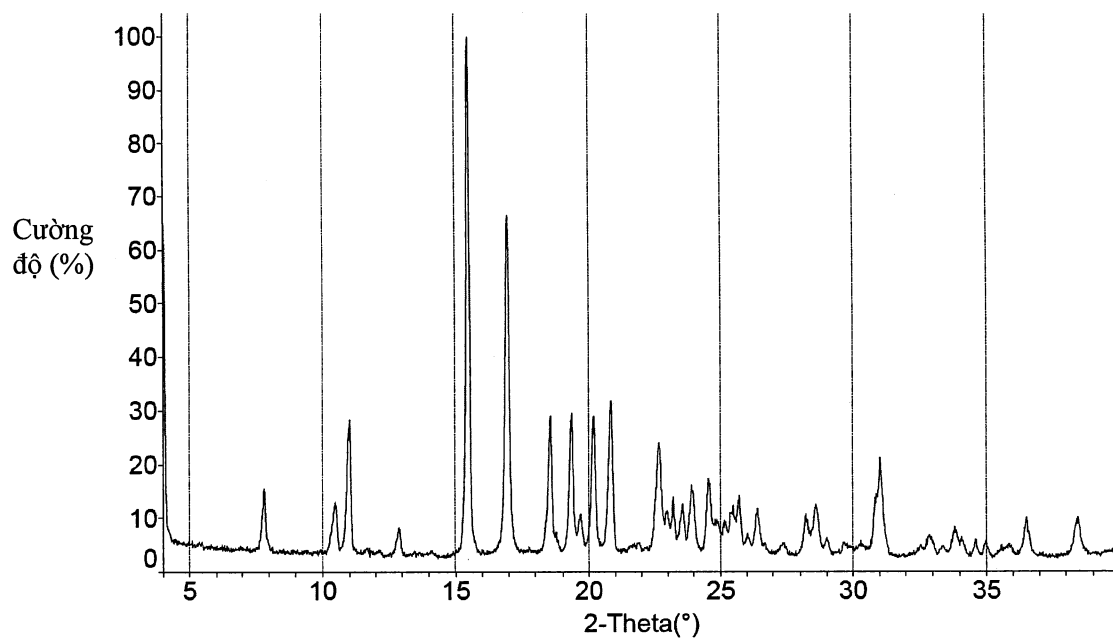


Fig. 1

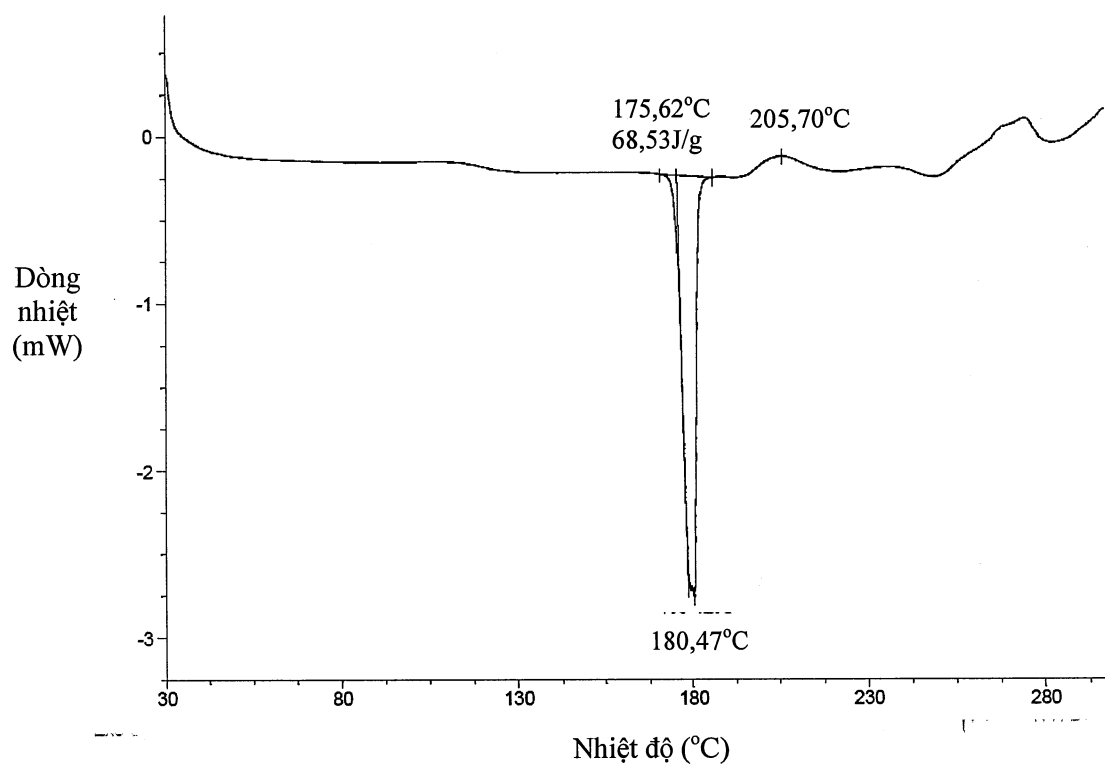


Fig. 2

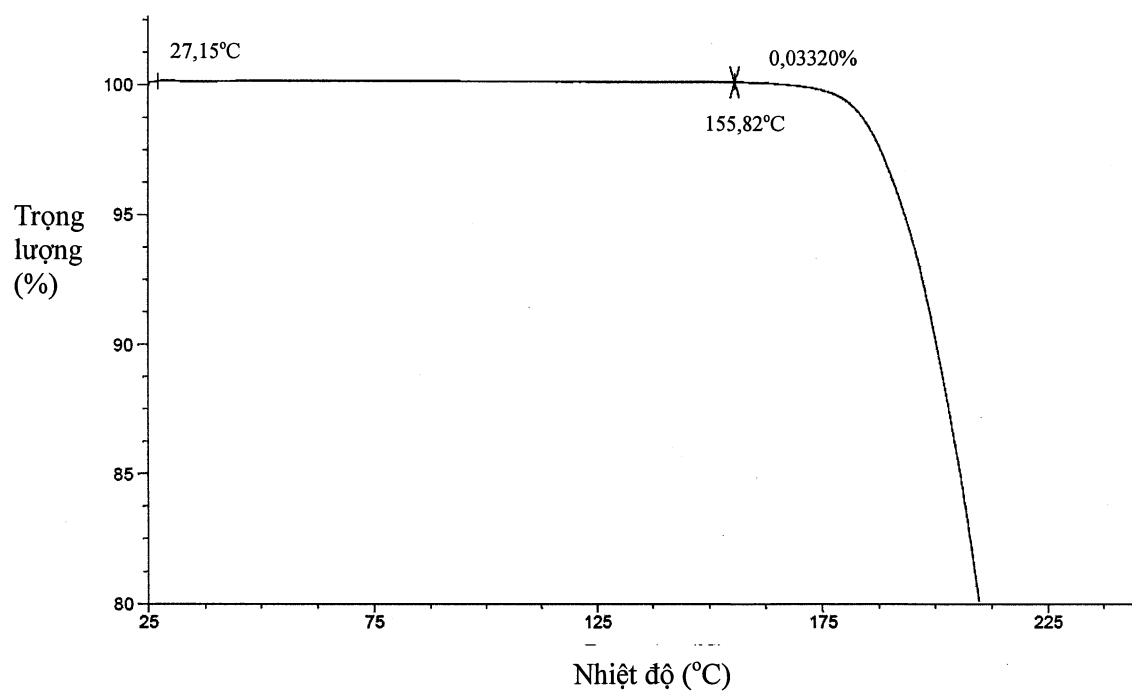


Fig. 3

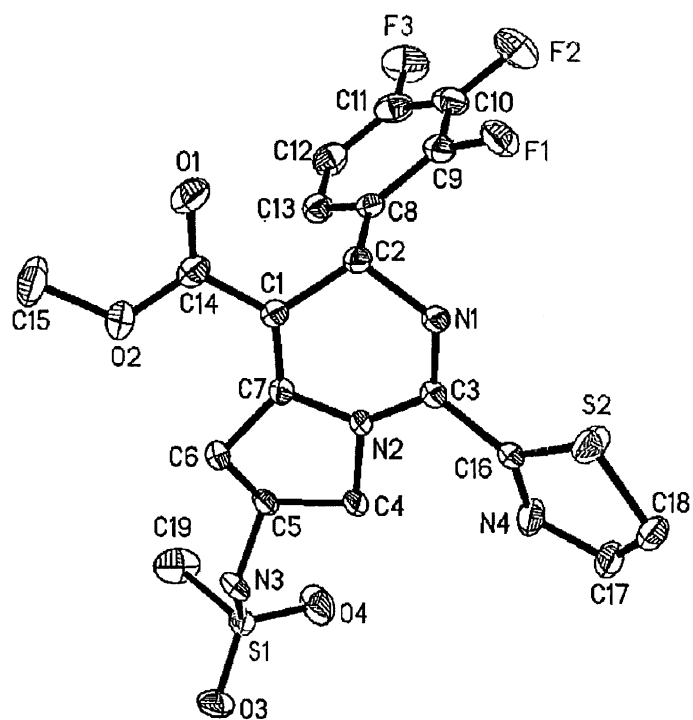


Fig. 4