



(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)



1-0032459

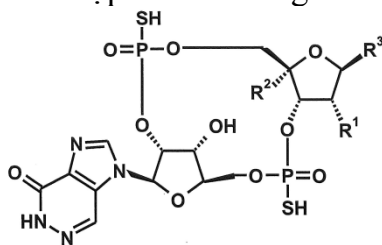
(51)⁷ C07H 21/02; C07H 19/23; A61K
31/7076; A61P 37/00

(13) B

(21) 1-2019-01501 (22) 28/09/2017
(86) PCT/EP2017/074608 28/09/2017 (87) WO2018/060323 05/04/2018
(30) 16191919.6 30/09/2016 EP
(45) 25/07/2022 412 (43) 25/07/2019 376A
(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Germany
(72) OOST, Thorsten (DE); CAROTTA, Sebastian (AT); FLECK, Martin (DE).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT DINUCLEOTIT DẠNG VÒNG, CHẤT ĐỒNG PHÂN LẬP THỂ GẦN NHƯ TINH KHIẾT VÀ MUỐI DƯỢC DỤNG CỦA HỢP CHẤT NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

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



trong đó nhóm R¹, R² và R³ là như được xác định trong bản mô tả, mà có các đặc tính dược lý có giá trị, đặc biệt là chất điều hoà STING. Sáng chế còn đề cập đến chất đồng phân lập thể gần như tinh khiết hoặc muối dược dụng của hợp chất này và dược phẩm chứa chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất dinucleotit dạng vòng ("CDNs"- cyclic dinucleotide) mới có công thức I, bao gồm muối được dụng của nó, bao gồm phi nucleobazơ purin imidazopyridazinon, một gốc nucleobazơ purin và một gốc 2',5'-phosphothioat không chính tắc và gây ra việc sản xuất xytokin. Sáng chế còn đề cập đến được phẩm và tổ hợp chứa hợp chất theo sáng chế. Chúng hữu ích để điều trị các bệnh liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING (chất kích thích gen interferon-Stimulator of Interferon Genes). Đặc biệt, được phẩm theo sáng chế là thích hợp để điều trị bệnh viêm, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn, bệnh truyền nhiễm, bệnh ung thư và làm tá được vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vai trò của hệ miễn dịch là bảo vệ cơ thể khỏi các mầm bệnh và tế bào ác tính. Tuy nhiên, virus và tế bào ung thư luôn tìm cách tránh hệ miễn dịch. Do đó, mục đích của phép trị liệu miễn dịch là để khơi mào đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên hoặc để tái hoạt hoá đáp ứng đã tồn tại trước ở một số loại tế bào nhất định của hệ miễn dịch chống lại chất xâm lấn gây bệnh hoặc tế bào ung thư.

Hệ miễn dịch gồm có một vài chuỗi chuyên biệt có thể được chia đại thể thành hai nhánh, hệ miễn dịch bẩm sinh và hệ miễn dịch thích ứng. Để có phản ứng miễn dịch thành công, chuỗi từ cả hai nhánh phải hoạt động nhịp nhàng. Vai trò chính của hệ miễn dịch bẩm sinh là gắn đáp ứng miễn dịch nhanh vào mầm bệnh hoặc tế bào ác tính, mà mà không giống như hệ thích ứng, nó không phải là kháng nguyên đặc hiệu và sống lâu. Ngoài việc giết chết trực tiếp mầm bệnh hoặc tế bào bị biến đổi, hệ miễn dịch bẩm sinh còn hoạt hoá và tiếp theo hướng về hệ miễn dịch thích ứng. Tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào có tua bắt và trình diện kháng nguyên ở dạng phức có tính tương hợp mô chuyên peptit (MHC) với tế bào T ở mô bạch huyết. Việc trình diện kháng nguyên cùng với việc tiết xytokin nhất định dẫn đến việc hoạt hoá và biệt hoá tế bào T CD4 và CD8 thực hiện đặc hiệu kháng nguyên. Việc sản xuất interferon typ I (IFN) bằng tế bào

trình diện kháng nguyên, và các loại tế bào khác, được coi là sự kiện chính trong việc hoạt hoá tế bào T do việc thiếu IFN typ I sẽ làm giảm đáp ứng miễn dịch phụ thuộc tế bào T chống lại việc lây nhiễm virus hoặc tế bào khối u (Zitvogel et al, *Bản chất Reviews Immunology* 15, 405 - 414, 2015). Mặt khác, sự có mặt của dấu hiệu IFN typ I trong quá trình trị liệu ung thư thường đi kèm với việc gia tăng số lượng tế bào T thâm nhập khối u và kết quả lâm sàng thuận lợi tiềm tàng (Sistigu et al, *Bản chất Medicine* 20, 1301 – 1309, 2014).

Các nghiên cứu gần đây trên chuột đã cho thấy rằng việc tiết IFN typ I một cách hiệu quả trong môi trường vi mô chuột và việc gây ra đáp ứng miễn dịch phụ thuộc tế bào T chống lại tế bào ung thư phụ thuộc vào sự có mặt của chất kích thích gen interferon (*stimulator of interferon genes*) protein thích ứng (STING, còn được biết là Tmem173, MPYS, MITA, ERIS)(Woo et al, *Immunity* 41, 5, 830 – 842, 2014; Corrales et al, *Cell Reports* 11, 1018 – 1030, 2015; Deng et al, *Immunity* 41, 5, 843 – 852, 2014). Tầm quan trọng của việc có mặt IFN typ I được chú ý bởi thực tế là việc khuyết đoạn của STING dẫn đến lượng IFN typ I giảm trong môi trường vi mô chuột và tác dụng kháng u giảm ở một vài mô hình chuột mắc khối u. Mặt khác, việc hoạt hoá đặc hiệu STING làm cải thiện đáp ứng miễn dịch tế bào T đặc hiệu kháng nguyên chống lại tế bào ung thư.

STING thuộc về họ các chất cảm biến axit nucleic và là chất thích ứng cho việc truyền tín hiệu ADN bào tan. Ở trạng thái cơ bản của nó, STING tồn tại dưới dạng dimer với miền đầu tận N của nó được neo trong ER và miền đầu tận C cư trú trong phân bào tan. Di-nucleotit dạng vòng (CDNs), được tạo ra bởi synthaza GMP-AMP protein vòng (cGAS) là phối tử tự nhiên của STING (Ablasser et al, *Nature* 498, 380 – 384, 2013). Việc gắn kết CDNs vào STING gây ra sự thay đổi hình dạng mà cho phép gắn kết và hoạt hoá kinaza gắn kết TANK (TANK binding kinase-TBK1) và yếu tố điều hòa interferon 3 (interferon chất điều hòa factor 3-IRF3) và di chuyển từ ER đến hạt cơ quan nội bào quanh nhân (Liu et al, *Science* 347, Issue 6227, 2630-1 – 2630-14, 2015). Việc phosphoryl hóa yếu tố phiên mã IRF3 và NF- κ B bằng TBK1 gây ra sự biểu hiện của cytokin bội bao gồm IFN typ I.

Dựa vào tầm quan trọng của IFN typ I trong một vài khối u ác tính bao gồm truyền nhiễm virus và trị liệu ung thư, các phác đồ cho phép việc hoạt hoá đặc hiệu STING là lợi ích của phép trị liệu.

WO 2014/189805 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng gồm hai nucleobazo purin và ít nhất một gốc 2',5'-phosphodiester hoặc phosphothioat không chính tắc và gây ra việc sản xuất cytokin phụ thuộc STING.

WO 2015/185565 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng bao gồm hai nucleobazo purin, một hoặc hai xyclopentan thay vì nhân tetrahydrofuran ribosa và một gốc 2',5'-phosphodiester không chính tắc và điều hoà STING.

WO 2016/120305 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng bao gồm hai nucleobazo purin, một gốc ribosa trong đó 2'-OH được thay bằng 2'-F và một gốc 2',5'-phosphodiester không chính tắc và điều hoà STING.

US 2014/0329889, WO 2014/099824, WO 2015/017652, Cell 154, 748–762 (2013), và Molecular Cell 51, 226–235 (2013) mô tả dinucleotit 2'3'-cGAMP dạng vòng ([G(2',5')pA(3',5')p] dạng vòng) bao gồm hai nucleobazo purin, một gốc 3',5'-phosphodiester chính tắc và một gốc 2',5'-phosphodiester không chính tắc. 2'3'-cGAMP liên kết không chính tắc gắn kết với STING ở người với ái lực cao hơn 3'3'-cGAMP liên kết chính tắc hoặc c-di-GMP của vi khuẩn đối xứng và gây ra việc sản xuất interferon typ I.

WO 2014/093936 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng gồm hai nucleobazo purin và hai gốc 3',5'-phosphodiester hoặc phosphothioat chính tắc và gây ra việc sản xuất cytokin phụ thuộc STING.

US 7,709,458 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng bao gồm hai nucleobazo purin và hai gốc 3',5' phosphodiester chính tắc và có thể được sử dụng để ức chế sự tăng sinh

tế bào ung thư hoặc làm tăng việc chết theo lập trình của tế bào ung thư, đặc biệt là CDN c-di-GMP của vi khuẩn bất đối xứng.

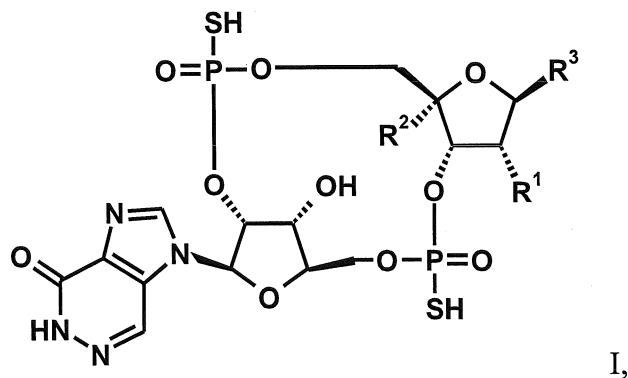
US 7,592,326 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng kích thích miễn dịch bao gồm hai nucleobazơ purin và hai gốc 3',5'-phosphodiester chính tắc, đặc biệt là CDN c-di-GMP của vi khuẩn đối xứng.

WO 2016/096174 và WO 2016/145102 mô tả hợp chất dinucleotit dạng vòng gồm hai nucleobazơ purin và hai gốc 3',5'-phosphodiester hoặc phosphothioat chính tắc và gây ra việc sản xuất xytokin phụ thuộc STING.

Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 5631–5634 mô tả chất tương tự mono- và bisphosphothioat kích thích miễn dịch của CDN c-di-GMP của vi khuẩn đối xứng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất dinucleotit dạng vòng có công thức I:



trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm H, F, $-O-C_{1-3}$ -alkyl và OH, và

R^2 là H, hoặc

R^2 là $-CH_2-$ và R^1 là $-O-$, cùng nhau tạo thành cầu $-CH_2-O-$ (“axit nucleic bị khoá” “Locked Nucleic Acid-LNA”), và

R³ là nucleobazơ purin được chọn từ nhóm bao gồm purin, adenin, guanin, xanthin, hypoxanthin, được nối qua nitơ N⁹ của nó;

các dạng tương đồng, dạng hồ biến, chất đồng phân lập thể, chất chuyển hóa, tiền dược chất, solvat, hydrat, và các muối của chúng, nhất là các muối chấp nhận được về mặt sinh lý của chúng với các bazơ vô cơ hoặc hữu cơ, hoặc các tổ hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất mới có công thức I, bao gồm muối dược dụng của nó, mà nó gây ra việc sản xuất xytokin theo kiểu phụ thuộc STING *in vitro* và/hoặc *in vivo* và có các đặc tính dược lý và dược động thích hợp để dùng trong trị liệu, nghĩa là, dùng để làm thuốc.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất mới có công thức I, bao gồm muối dược dụng của nó, để dùng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất mới có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, để điều trị bệnh viêm, dị ứng hoặc tự miễn, ví dụ, viêm mũi dị ứng hoặc hen, để điều trị bệnh truyền nhiễm hoặc ung thư, hoặc để dùng làm tá dược vacxin.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING, ở đối tượng bao gồm bước cho dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, cho đối tượng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm, dị ứng hoặc tự miễn, ví dụ, viêm mũi dị ứng hoặc hen, để điều trị bệnh truyền nhiễm hoặc ung thư, ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng, của nó cho bệnh nhân.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm hợp chất có công thức I hoặc muối dược dụng của nó và một hoặc nhiều tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I, bao gồm muối dược dụng của nó, để bào chế thuốc để dùng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó việc điều hoà STING là có lợi hoặc để dùng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, để bào chế thuốc để dùng trong điều trị bệnh viêm, dị ứng hoặc tự miễn, ví dụ, viêm mũi dị ứng hoặc hen, để điều trị bệnh truyền nhiễm hoặc ung thư, hoặc để dùng làm tá dược vaccin.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa.

Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa và một hoặc nhiều tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa để dùng trong trị liệu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa để dùng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó việc điều hoà STING là có lợi hoặc để dùng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối dược dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa để dùng trong điều trị bệnh viêm, bệnh dị ứng và bệnh tự miễn, bệnh truyền nhiễm và ung thư.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng trong đó việc điều hoà STING là có lợi hoặc của bệnh hoặc tình trạng có liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING, ở bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu trị liệu của tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm, dị ứng hoặc tự miễn, bệnh truyền nhiễm hoặc ung thư, ở bệnh nhân, bao gồm bước cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu trị liệu của tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, và ít nhất một tác nhân trị liệu nữa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tá dược vacxin bao gồm hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm miễn dịch bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên và hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm miễn dịch bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên và hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để dùng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để bào chế chế phẩm miễn dịch bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh bao gồm bước cho người mắc hoặc dễ mắc bệnh dùng, chế phẩm miễn dịch bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên và hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên và hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để dùng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để bào chế chế phẩm vaccin bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh bao gồm bước cho người mắc hoặc dễ mắc bệnh dùng, chế phẩm vaccin bao gồm kháng nguyên hoặc chế phẩm kháng nguyên và hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó.

Các mục đích khác của sáng chế trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực thông qua phần mô tả ở trên và dưới đây và thông qua các ví dụ.

Hợp chất theo sáng chế có một vài ưu điểm, như ái lực gắn kết thuận lợi với STING ở người, hoạt tính tế bào thuận lợi, nghĩa là, ở các tế bào mang alen STING ở người khác nhau, độ bền thuận lợi trong các thử nghiệm tế bào, và các đặc tính dược động (pharmacokinetic-PK) thuận lợi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, R^1 , R^2 và R^3 được xác định như trên và dưới đây. Một số nghĩa được ưu tiên của các phần tử thể riêng rẽ của hợp chất theo sáng chế sẽ được nêu dưới đây. Bất kỳ và mỗi trong số các định nghĩa này có thể được kết hợp với nhau.

R^1 và R^2

Theo phương án thứ nhất, R^1 và R^2 là như được xác định trên đây.

Theo phương án khác, cả R^1 và R^2 cùng là H.

Theo phương án khác nữa, R^1 là F và R^2 là H.

Theo phương án khác nữa, R^1 là -OH và R^2 là H.

Theo phương án khác nữa, R^1 là $-OCH_3$ và R^2 là H.

Theo phương án khác nữa, R^1 là $-O-$ và R^2 là $-CH_2-$, cùng nhau tạo thành cầu $-O-CH_2-$.

R^3 :

Theo phương án thứ nhất, R^3 là như được xác định trên đây.

Theo phương án khác, R^3 là purin, được nối qua nitơ N^9 của nó.

Theo phương án khác, R^3 là adenin, được nối qua nitơ N^9 của nó.

Theo phương án khác nữa, R^3 là guanin, được nối qua nitơ N^9 của nó.

Theo phương án khác nữa, R^3 là xanthin, được nối qua nitơ N^9 của nó.

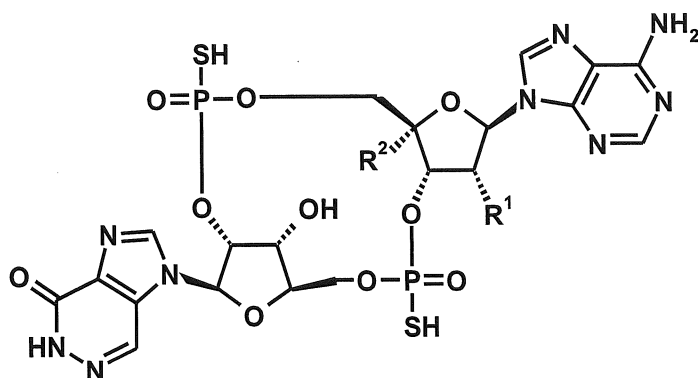
Theo phương án khác nữa, R^3 là hypoxanthin, được nối qua nitơ N^9 của nó.

Bảng sau thể hiện các phương án cụ thể hơn từ I-1 đến I-16 của hợp chất có công thức I:

Phương án	R	R	R là nucleobazơ purin được nối qua nitơ N^9 của nó, được chọn từ nhóm bao gồm
I-1	H	H	purin, adenin, guanin, xanthin, hypoxanthin
I-2	F	H	adenin
I-3	F	H	purin
I-4	F	H	guanin

I-5	F	H	xanthin
I-6	F	H	hypoxanthin
I-7	OH	H	adenin
I-8	OH	H	purin
I-9	OH	H	guanin
I-10	OH	H	xanthin
I-11	OH	H	hypoxanthin
I-12	R ¹ là –O– và R ² là -CH ₂ -, cùng nhau tạo thành cầu -O-CH ₂ -		adenin
I-13	R ¹ là –O– và R ² là -CH ₂ -, cùng nhau tạo thành cầu -O-CH ₂ -		purin
I-14	R ¹ là –O– và R ² là -CH ₂ -, cùng nhau tạo thành cầu -O-CH ₂ -		guanin
I-15	R ¹ là –O– và R ² là -CH ₂ -, cùng nhau tạo thành cầu -O-CH ₂ -		xanthin
I-16	R ¹ là –O– và R ² là -CH ₂ -, cùng nhau tạo thành cầu -O-CH ₂ -		hypoxanthin

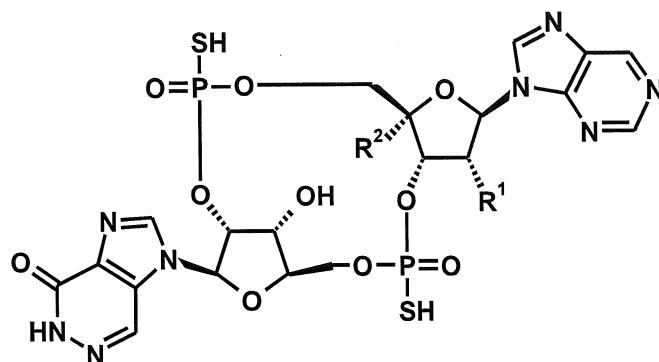
Công thức phụ được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế được thể hiện trong công thức Ia,



Ia,

trong đó R^1 và R^2 cũng như các phương án của nó là như được xác định trên đây.

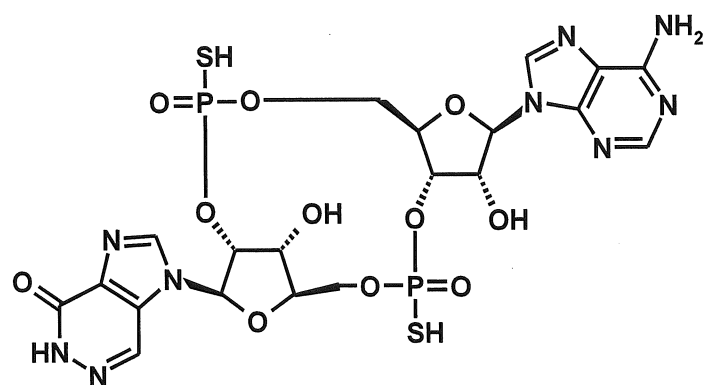
Công thức phụ được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế được thể hiện trong công thức Ib,



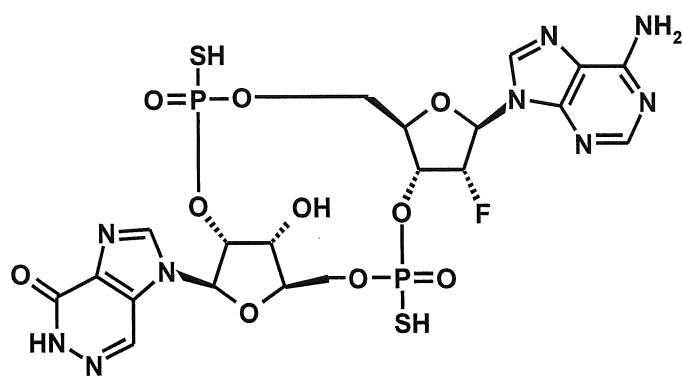
Ib

trong đó R^1 và R^2 cũng như các phương án của nó là như được xác định trên đây.

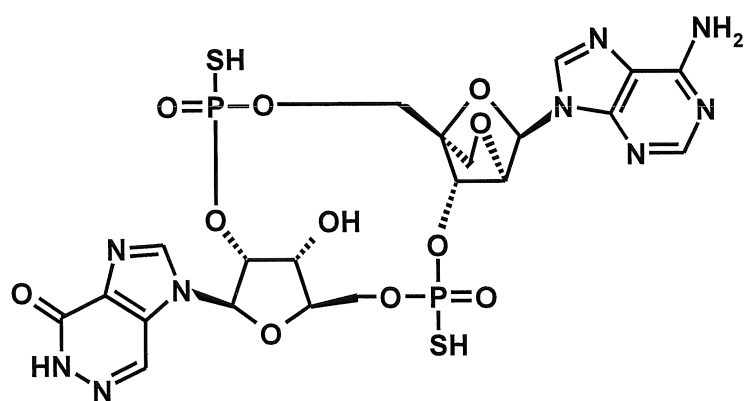
Các hợp chất theo sáng chế sau được ưu tiên đặc biệt:



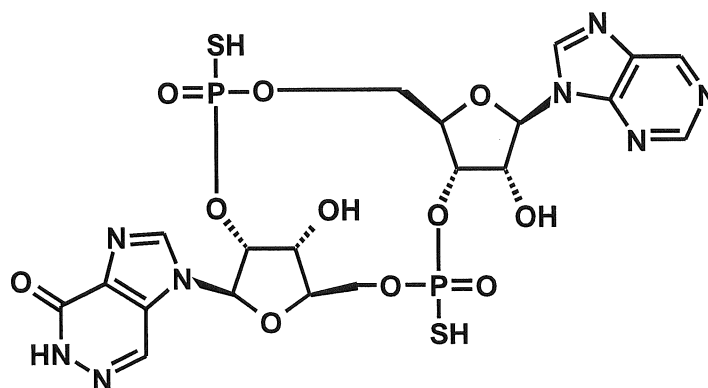
Ia.1,



Ia.2,



Ia.3, và



Ib.1

chất hỗ biến và chất đồng phân lập thể của chúng, muối của nó, đặc biệt là muối sinh lý dụng của nó với bazơ vô cơ hoặc hữu cơ, solvat hoặc hydrat của chúng.

Hợp chất theo sáng chế có nguyên tử phospho bất đối xứng với cấu hình Rp hoặc Sp. Toàn bộ các chất đồng phân lập thể của hợp chất có công thức chung I, Ia, Ib, Ia.1, Ia.2, Ia.3 và Ib.1, ở dạng gần như tinh khiết hoặc dưới dạng hỗn hợp của chúng, đều được bao hàm bởi sáng chế. Hợp chất có công thức chung I, Ia, Ib, Ia.1, Ia.2, Ia.3 và Ib.1 ở dạng chất đồng phân lập thể (Rp,Rp), (Rp,Sp), (Sp,Rp) hoặc (Sp,Sp) gần như tinh khiết được ưu tiên, đặc biệt là chất đồng phân lập thể (Rp,Rp) gần như tinh khiết, nghĩa là, cả hai nguyên tử phospho cùng có cấu hình Rp.

Hợp chất theo sáng chế và các hợp chất trung gian của chúng có thể thu được sử dụng các phương pháp tổng hợp đã biết đối với một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và được mô tả trong tài liệu về tổng hợp hữu cơ. Các hợp chất tốt hơn thu được theo cách tương tự với các phương pháp điều chế được giải thích đầy đủ hơn sau đây, đặc biệt là như được mô tả trong phần thực nghiệm. Trong một số trường hợp, thứ tự được dùng để thực hiện các sơ đồ phản ứng có thể thay đổi. Các biến thể của các phản ứng này mà đã biết đối với một người có kỹ năng trong lĩnh vực nhưng không được mô tả chi tiết ở đây cũng có thể được sử dụng. Các quy trình chung để điều chế hợp chất theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với một người có kỹ năng trong lĩnh vực khi nghiên cứu các sơ đồ sau. Các hợp chất ban đầu có sẵn trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu hoặc ở đây hoặc có thể được điều chế theo cách tương tự hoặc giống hệt. Trước khi tiến hành phản ứng, nhóm chức tương ứng bất kỳ trong hợp chất này có thể được khử nhóm bảo vệ bằng cách sử dụng các nhóm

bảo vệ thông thường. Các nhóm bảo vệ này có thể lại được tách ra ở giai đoạn thích hợp trong trình tự phản ứng sử dụng các phương pháp đã biết đối với một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Dinucleotit dạng vòng được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được điều chế như được mô tả chi tiết dưới đây, hoặc bằng các phương pháp khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng các sơ đồ này không nhằm mục đích giới hạn và có thể thực hiện các biến thể của các chi tiết mà không vượt ra ngoài tinh thần của sáng chế.

Hợp chất dinucleotit dạng vòng có thể thu được bằng các phương pháp được mô tả trong Chem. Rev. 113, 7354–7401 (2013), Org. Lett., 12, 3269–3271 (2010), Tetrahedron 49, 1115–1132 (1993), WO 2014/189805, WO 2016/096174, WO 2015/185565, WO 2016/145102 hoặc WO 2016/120305 và các tài liệu viện dẫn trong đó.

Thuật ngữ "nhóm bảo vệ" như được sử dụng trong bản mô tả này, và trừ khi có quy định khác, dùng để chỉ nhóm chức hoá học được gắn vào nguyên tử oxy, nitơ hoặc phospho để ngăn ngừa phản ứng tiếp của nguyên tử này, hoặc vì mục đích khác. Rất nhiều loại nhóm bảo vệ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ đã biết, và được mô tả, ví dụ, trong tài liệu "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Third Edition, 1999.

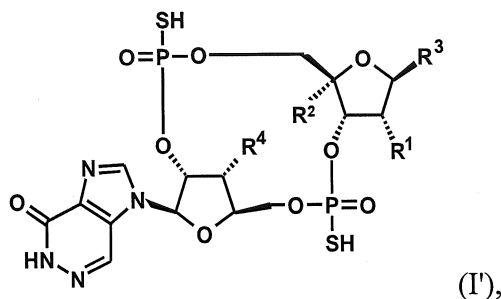
Hợp chất có công thức (I) và muối của nó có thể được điều chế bằng các phương pháp được mô tả dưới đây, cấu thành các khía cạnh khác của sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết ra rằng các gốc phosphothioat trong công thức (I) có thể tồn tại trong cấu hình R (R_P) hoặc cấu hình S (S_P). Các phương pháp được mô tả dưới đây có thể tạo ra đến bốn chất đồng phân không đối quang tương ứng với các nguyên tử phospho mà có thể tách được bằng các phương pháp sắc ký mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ, sắc ký

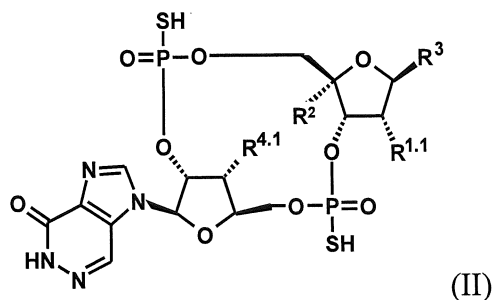
lòng hiệu năng cao với hệ dung môi thích hợp và cột ở các giai đoạn khác nhau của quá trình tổng hợp. Trong một số trường hợp, ví dụ, khi một sulfurin hoá bước xảy ra theo kiểu chọn lọc lập thể, tốt hơn nếu phương pháp được mô tả dưới đây có thể chỉ tạo ra hai chất đồng phân không đối quang mà có thể tách được bằng các phương pháp sắc ký mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết ở các giai đoạn khác nhau của quá trình tổng hợp.

Các phần tử thể không được chỉ định rõ ràng trong các phương pháp điều chế sau được hiểu hiểu là bao hàm cả các định nghĩa nêu trên trong phần Bản chất kỹ thuật của sáng chế.

Hợp chất có công thức:

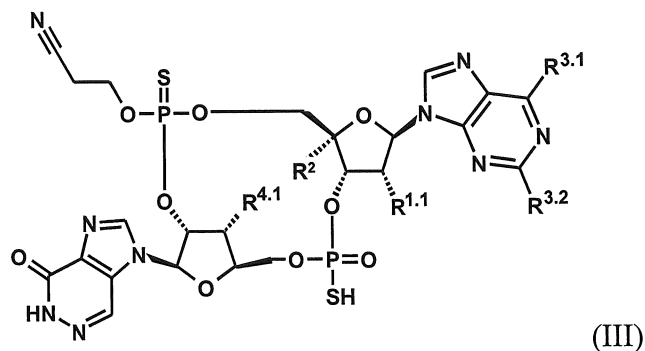


trong đó R^4 và tùy ý R^1 là OH, có thể được điều chế bằng cách khử nhóm bảo vệ của hợp chất có công thức (II),



trong đó $R^{4.1}$ và tùy ý $R^{1.1}$ là oxy mang nhóm bảo vệ thích hợp, như *tert*-butyldimethylsilyl (TBS). Ví dụ, $R^{1.1}$ là H, F, O-alkyl hoặc OTBS hoặc, cùng với R^2 , tạo thành cầu -CH₂-O-, và $R^{4.1}$ là OTBS. Ví dụ, hợp chất có công thức (II) được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, pyridin, xử lý được bằng hỗn hợp gồm triethylamin trihydroflorua và triethylamin và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20-60°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 1-6 giờ.

Hợp chất có công thức (II) có thể được điều chế bằng cách khử nhóm bảo vệ của hợp chất có công thức (III),



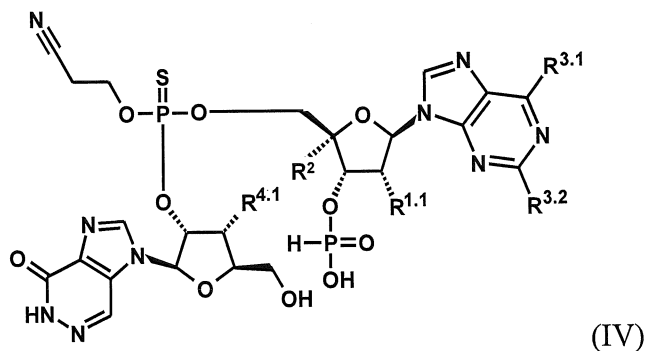
trong đó $R^{3,1}$ dùng để chỉ NH mang nhóm bảo vệ thích hợp, như benzoyl, và $R^{3,2}$ dùng để chỉ H (“adenin được bảo vệ”) hoặc

$R^{3,1}$ dùng để chỉ OH và $R^{3,2}$ dùng để chỉ NH mang nhóm bảo vệ thích hợp, như *iso*-butyryl (“guanin được bảo vệ”) hoặc

$R^{3,1}$ dùng để chỉ OH và $R^{3,2}$ dùng để chỉ H (“hypoxanthin”) hoặc cả hai $R^{3,1}$ và $R^{3,2}$ dùng để chỉ H (“purin”).

Ví dụ, hợp chất có công thức (III) được hoà tan trong hỗn hợp thích hợp, ví dụ, metylamin hoặc dung dịch nước amoniac trong metanol hoặc etanol, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20-60°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 1-24 giờ.

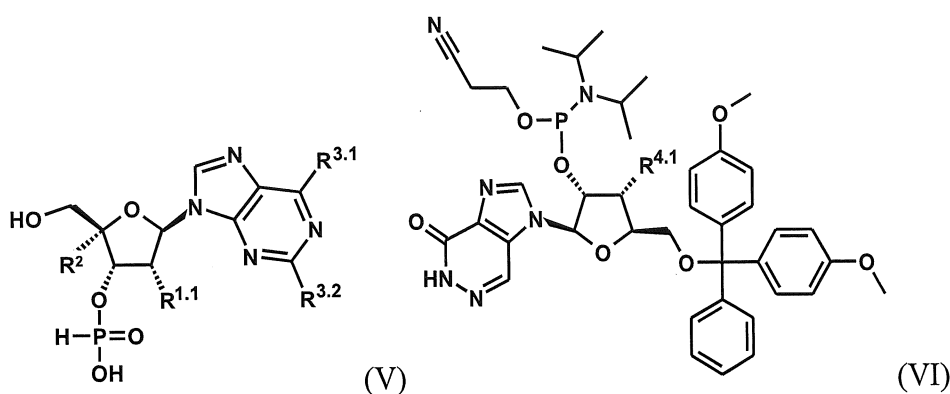
Hợp chất có công thức (III) có thể được điều chế bằng cách vòng hoá và tiếp theo sulfurin hoá hợp chất có công thức (IV), trong đó R^2 , $R^{3,1}$, $R^{3,2}$, $R^{1,1}$ và $R^{4,1}$ là như được xác định trên đây:



Ví dụ, hợp chất có công thức (IV) được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, pyridin, và xử lý được bằng chất phản ứng liên hợp thích hợp, ví dụ, 2-clo-5, 5-dimetyl-

1,3,2-dioxaphosphorinan 2-oxit (DMOCP) hoặc pivaloyl clorua hoặc adamantoyl clorua, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 0,1-2 giờ. Phản ứng vòng hoá được dập tắt bằng cách xử lý bằng chất phản ứng sulfurin hoá thích hợp, ví dụ, 3*H*-1,2-benzodithiol-3-on hoặc lưu huỳnh nguyên tố, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 0,1-2 giờ.

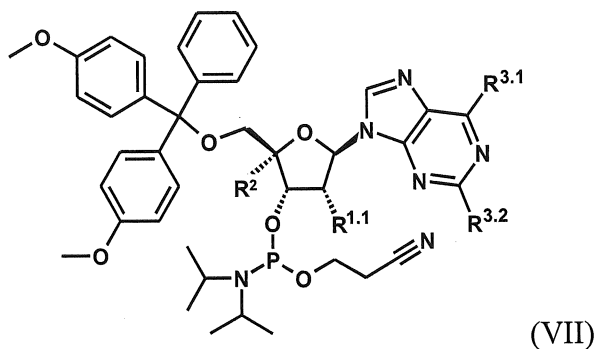
Hợp chất có công thức (IV) có thể được điều chế bằng cách liên hợp hợp chất có công thức (V) với hợp chất có công thức (VI), trong đó R², R^{3,1}, R^{3,2}, R^{1,1} và R^{4,1} là như được xác định trên đây:



Ví dụ, hợp chất có công thức (VI) được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, axetonitril, và xử lý được bằng dung dịch chứa hợp chất có công thức (V) hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, axetonitril, tùy ý với sự có mặt của chất phản ứng liên hợp thích hợp, ví dụ, tetrazol, Chất hoạt hoá 42® (dung dịch chất hoạt hoá, chứa 5-(3,5-bis(triflometyl)phenyl)-1*H*-tetrazol trong axetonitril), pyridini dicloaxetat hoặc pyridini trifloaxetat (hoặc hỗn hợp gồm các chất phản ứng liên hợp), và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 0,1-2 giờ. Phản ứng liên hợp được dập tắt bằng cách xử lý bằng chất phản ứng sulfurin hoá thích hợp, ví dụ, 3-((*N,N*-dimetylaminometyliden)amino)-3*H*-1,2,4-dithiazol-3-thion (DDTT) hoặc phenylaxetyl disulfua (PADS) hoặc 3*H*-1,2-benzodithiol-3-on 1,1-dioxit (chất phản ứng Beaucage), và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 0,1-2 giờ. Sau khi làm bay hơi dung môi, cặn được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, hỗn hợp gồm diclometan và nước, và xử lý được bằng chất phản ứng thích hợp, ví dụ, axit dicloaxetic, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích

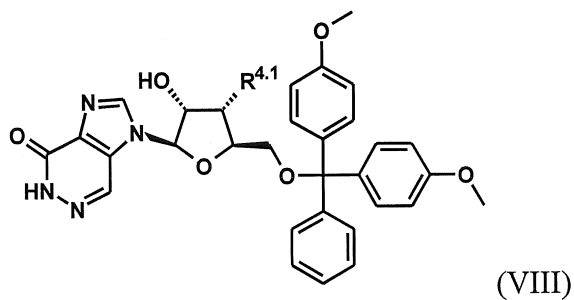
hợp, ví dụ, 0,1-2 giờ. Dung dịch chứa sản phẩm (IV) thu được bằng việc bổ sung dung môi thích hợp, ví dụ, pyridin, và cô bằng cách làm bay hơi.

Hợp chất có công thức (V) có thể được điều chế bằng cách phản ứng của hợp chất có công thức (VII), trong đó R^2 , $R^{3,1}$, $R^{3,2}$, $R^{1,1}$ và $R^{4,1}$ là như được xác định trên đây:



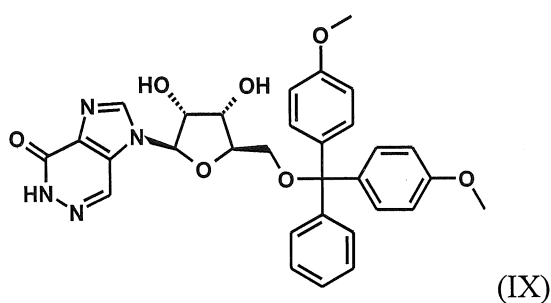
Ví dụ, hợp chất có công thức (VII) được hoà tan trong hỗn hợp thích hợp, ví dụ, axetonitril chứa nước, và xử lý được bằng pyridini trifloaxetat, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 1-30 phút. Tiếp theo, *tert*-butylamin được bổ sung và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 0,1-1 giờ. Sản phẩm này được tách bằng cách làm bay hơi dung môi, tiếp theo, hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, diclometan chứa nước, và xử lý được bằng axit dicloaxetic và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 0,1-1 giờ. Thu được dung dịch chứa sản phẩm (V) trong axetonitril, ví dụ, bằng cách bổ sung pyridin, tiếp theo là đồng sôi hỗn hợp này với axetonitril.

Hợp chất có công thức (VI) có thể được điều chế bằng phản ứng của hợp chất có công thức (VIII), trong đó $R^{4,1}$ là như được xác định trên đây:



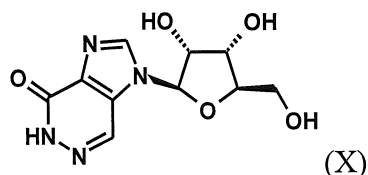
Ví dụ, sau khi đồng sôi với dung môi thích hợp, ví dụ, axetonitril, hợp chất có công thức (VIII) được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, diclometan, và cho phản ứng với chất phản ứng phosphoryl hóa, ví dụ, 2-xyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphodiamit, với sự có mặt của chất hoạt hoá, ví dụ, 1H-tetrazol, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 1-48 giờ.

Hợp chất có công thức (VIII) có thể được điều chế bằng phản ứng của hợp chất có công thức (IX):



Ví dụ, hợp chất có công thức (IX) được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, pyridin, và cho phản ứng với chất phản ứng silyl hóa thích hợp, ví dụ, *tert*-butyldimetylsilyl clorua, với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, imidazol, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 1-48 giờ. Các sản phẩm 2' và 3'-silyl hóa đồng phân vị trí tách được sau khi xử lý trong nước và có thể tách được, ví dụ, bằng sắc ký silica gel với hệ dung môi thích hợp.

Hợp chất có công thức (IX) có thể được điều chế bằng phản ứng của hợp chất có công thức (X):



Ví dụ, hợp chất có công thức (X) được hoà tan trong dung môi thích hợp, ví dụ, pyridin, và cho phản ứng với 4,4'-dimetoxytrityl clorua, và khuấy ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ, 20°C, trong khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 1-48 giờ.

Hợp chất có công thức chung I, hoặc hợp chất trung gian tổng hợp của nó, có thể được phân giải thành chất đồng phân không đối quang của chúng như nêu dưới đây. Hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang gồm hợp chất có công thức chung I có thể được phân giải thành chất đồng phân không đối quang của chúng bằng cách lấy các ưu điểm của các đặc tính hóa lý khác nhau của chúng bằng cách sử dụng các phương pháp đã tự biết, ví dụ, sắc ký và/hoặc kết tinh phân đoạn.

Như đã nêu ở trên, hợp chất có công thức I có thể được chuyển hoá thành các muối, nhất là việc sử dụng ở dạng được phẩm thành các muối được dụng.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể thu được một cách thuận lợi sử dụng các phương pháp được mô tả trong các ví dụ sau đây, các phương pháp này cũng có thể được kết hợp cho mục đích này với các phương pháp đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực.

Các thuật ngữ và định nghĩa

Các thuật ngữ không được xác định cụ thể ở đây nên lấy nghĩa được gán cho chúng bởi một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bộc lộ và theo ngữ cảnh. Tuy nhiên, theo sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi được xác định ngược lại, các thuật ngữ sau đây có ý nghĩa được chỉ rõ và những quy ước sau đây được tuân thủ.

Thuật ngữ "(các) hợp chất theo sáng chế", "(các) hợp chất có công thức (I)", "(các) hợp chất theo sáng chế" và tương tự dùng để chỉ hợp chất có công thức (I) theo sáng chế bao gồm chất hỗn biến, chất đồng phân lập thể của chúng và hỗn hợp của nó và các muối của nó, cụ thể là muối được dụng của nó, và solvat và hydrat của hợp chất này, bao gồm solvat và hydrat của chất hỗn biến này, chất đồng phân lập thể và muối của nó.

Thuật ngữ "việc điều trị" và "điều trị" bao gồm cả việc phòng ngừa, nghĩa là, dự phòng, hoặc trị liệu, nghĩa là, điều trị chữa bệnh và/ hoặc làm thuyên giảm. Do vậy, thuật ngữ "việc điều trị" và "điều trị" bao gồm điều trị trị liệu bệnh nhân đã phát triển tình trạng bệnh này, cụ thể là ở dạng dễ phát hiện. Điều trị trị liệu có thể là điều trị triệu chứng để

làm giảm triệu chứng của dấu hiệu cụ thể hoặc điều trị nguyên nhân để đảo ngược hoặc đảo ngược một phần tình trạng của dấu hiệu hoặc làm ngừng hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh. Do vậy, dược phẩm và các phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng ví dụ, để điều trị triệu chứng trong một khoảng thời gian cũng như để điều trị mạn tính. Ngoài ra, thuật ngữ "việc điều trị" và "điều trị" bao gồm điều trị dự phòng, nghĩa là, điều trị bệnh nhân có nguy cơ phát triển tình trạng bệnh nêu trên, do vậy, giảm được nguy cơ này.

Khi sáng chế đề cập đến bệnh nhân cần điều trị, nó chủ yếu đề cập đến việc điều trị ở động vật có vú, cụ thể là người.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu điều trị" nghĩa là lượng hợp chất theo sáng chế mà (i) điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể, (ii) làm giảm, làm thuyên giảm, hoặc loại trừ một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể, hoặc (iii) ngăn ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "điều chỉnh" hoặc "điều hoà", hoặc "điều biến", như được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi có quy định khác, đề cập đến việc hoạt hoá con đường STING bằng một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế, trong trường hợp này là chất chủ vận STING.

Thuật ngữ "qua trung gian" hoặc "nhờ trung gian" hoặc "trung gian", như được sử dụng ở đây, trừ khi có quy định khác, đề cập đến (i) việc điều trị, bao gồm cả phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh cụ thể, (ii) làm giảm, làm thuyên giảm, hoặc loại trừ một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh cụ thể, hoặc (iii) phòng ngừa hoặc làm chậm việc khởi phát một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh cụ thể được mô tả ở đây.

Nếu hợp chất theo sáng chế được mô tả ở dạng tên hóa học và dạng công thức, trong trường hợp có bất kỳ sự không nhất quán nào, thì công thức chiếm ưu thế.

Ký hiệu dấu sao có thể được sử dụng trong các công thức phụ để chỉ liên kết mà liên kết này được kết nối với phân tử lõi khi được xác định.

Trừ khi được chỉ ra cụ thể, trong Phần mô tả và Yêu cầu bảo hộ, một tên hoặc công thức hóa học được nêu sẽ bao hàm cả các tautome và tất cả các chất đồng phân lập thể, quang học và hình học (ví dụ các chất đồng phân đối ảnh, các chất đồng phân không đối quang, các chất đồng phân E/Z, v.v.) và các chất triệt quang của chúng cũng như các hỗn hợp với tỷ phần khác nhau của các chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ, các hỗn hợp của các chất đồng phân không đối quang, hoặc các hỗn hợp của dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên khi các chất đồng phân và các chất đồng phân đối ảnh như vậy tồn tại, cũng như các muối, gồm cả các muối được dụng của chúng và các solvat của chúng như ví dụ các hydrat gồm cả các solvat của các hợp chất tự do hoặc các solvat của muối của hợp chất.

Thuật ngữ “gần như tinh khiết” như được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến hợp chất có công thức chung I dùng để chỉ một chất đồng phân không đối quang (Rp,Rp), (Rp,Sp), (Sp,Rp) hoặc (Sp,Sp) mà ít nhất tinh khiết 75% so với chất đồng phân không đối quang có thể khác tương ứng với các nguyên tử phospho. Theo các phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức chung I gần như tinh khiết là ít nhất tinh khiết 85%, ít nhất tinh khiết 90%, ít nhất tinh khiết 95%, ít nhất tinh khiết 97%, và ít nhất tinh khiết 99%.

Thuật ngữ "được dụng" được dùng ở đây để chỉ các hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm và/hoặc các dạng liều mà, trong phạm vi của đánh giá y tế thích hợp, thích hợp để dùng tiếp xúc với mô người và động vật mà không gây độc hại, kích ứng, phản ứng dị ứng quá mức hoặc không gây ra vấn đề hoặc biến chứng khác và tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý.

Như được sử dụng ở đây, "muối được dụng" được dùng để chỉ các dẫn xuất của các hợp chất được bộc lộ ở đây, trong đó hợp chất gốc được cải biến bằng cách tạo ra các muối của nó với bazơ. Các muối được dụng theo sáng chế có thể được tổng hợp từ hợp

chất gốc mà chứa gốc axit bằng các phương pháp hóa học thông thường. Nói chung, các muối này có thể được điều chế bằng cách cho các dạng axit tự do của các hợp chất này phản ứng với lượng đủ của bazơ thích hợp trong nước hoặc trong chất pha loãng hữu cơ như ete, etyl axetat, etanol, isopropanol, hoặc axetonitril, hoặc hỗn hợp của chúng. Theo cách khác, muối có thể được điều chế bằng cách trao đổi ion, ví dụ, bằng cách xử lý dung dịch nước chứa hợp chất theo sáng chế (dạng axit tự do hoặc muối) với chất trao đổi cation.

Hoạt tính dược lý

Hợp chất theo sáng chế có ái lực gắn kết thuận lợi với STING ở người. Ái lực gắn kết có thể, ví dụ, được xác định bằng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh dựa trên thử nghiệm gần nhấp nháy (scintillation proximity assay-SPA) như được mô tả trong Nat. Chem. Biol. 10, 1043–1048 (2014). Theo cách khác, ái lực gắn kết có thể, ví dụ, được xác định bằng phép đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt (isothermal titration calorimetry-ITC) như được mô tả trong Molecular Cell 51, 226–235 (2013). Theo cách khác, ái lực gắn kết có thể, ví dụ, được xác định bằng cộng hưởng hệ gen bào chất bề mặt (bề mặt plasmon resonance-SPR) như được mô tả trong WO 2016/145102. Theo cách khác, ái lực gắn kết có thể được xác định bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (differential scanning fluorimetry-DSF), ví dụ như được mô tả trong WO 2016/145102.

Hợp chất theo sáng chế thể hiện hoạt tính tế bào thuận lợi. Sự cảm ứng xytokin *in vitro* có thể đo được trong dòng tế bào thông báo, ví dụ trong tế bào THP1, theo kiểu tương tự như được mô tả trong WO 2016/096174. Hợp chất theo sáng chế thể hiện hoạt tính tế bào thuận lợi ở các tế bào mang alen STING ở người khác nhau. STING ở người tồn tại trong ít nhất năm biến thể đã biết (WT, HAQ, REF / 232H, AQ, Q / 293 Q). Để kiểm tra hoạt tính của các CDN khác nhau trên các biến thể STING ở người, tế bào THP1-STING KO có thể được tải nạp ổn định với vật truyền mã hoá cho các biến thể STING khác nhau. Ngoài ra, sự cảm ứng xytokin *in vitro* có thể đo được ở tế bào PBMC nguyên thủy ở người hoặc tế bào có tua ở người.

Hợp chất theo sáng chế có độ bền thuận lợi trong thử nghiệm tế bào *in vitro*, ví dụ, với tế bào THP1, tế bào Calu-3 hoặc tế bào gan người. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có độ bền hoá học thuận lợi ở trạng thái dung dịch và trạng thái rắn.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có các đặc tính dược động (PK) thuận lợi. Các đặc tính PK có thể được xác định ở các loài động vật tiền lâm sàng, ví dụ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, chó, chuột lang, lợn nhỏ, khỉ cynomolgus, khỉ rhesus. Các đặc tính PK của một hợp chất có thể được mô tả, ví dụ, bằng các thông số sau: Thời gian lưu trung bình (mean residence time-MRT), thời gian bán thải ($t_{1/2}$, nghĩa là, thời gian cần để nồng độ thuốc đạt đến một nửa trị số ban đầu của nó), thể tích phân bố (V_D , nghĩa là, thể tích biểu kiến trong đó thuốc được phân phối), diện tích dưới đường cong (area under the curve-AUC, nghĩa là, tích phân của đường cong nồng độ-thời gian sau khi dùng liều đơn), độ thanh thải (clearance-CL, nghĩa là, thể tích huyết tương làm sạch thuốc trên mỗi đơn vị thời gian), như được mô tả trong E. Kerns & L. Di (Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization, Elsevier, 1st ed, 2008).

Các hợp chất nhất định theo sáng chế thể hiện hoạt tính dược lý *in vivo* thuận lợi, ví dụ trong các mô hình chuột MC38 ở chuột, 4T1, Trục tràng26, EMT6 sau khi dùng thuốc trong khối u hoặc trong tĩnh mạch.

Ái lực gắn kết có lợi khi kết hợp với hoạt tính tế bào thuận lợi và / hoặc độ ổn định tế bào thuận lợi và / hoặc các đặc tính PK được cải thiện có thể giúp làm giảm liều lượng về hiệu quả dược lý. Liều lượng thấp hơn có lợi thế về “tải lượng thuốc” hoặc “gánh nặng thuốc” thấp hơn (thuốc gốc và các sản phẩm chuyển hóa của nó) đối với bệnh nhân, dẫn đến tác dụng phụ tiềm tàng ít hơn và chi phí sản xuất sản phẩm thuốc thấp hơn.

Việc gắn kết hợp chất theo sáng chế với STING ở người có thể được chứng minh bằng cách sử dụng thử nghiệm sau:

PHÉP ĐO NHIỆT LƯỢNG QUÉT VI SAI (DSF)

Nguyên liệu:

Đĩa 384 lỗ, thành mỏng Hard-Shell®PCR (Catalog# HSP3805R, BIO-RAD)

Chất bịt kín Microseal®'B' dùng cho đĩa PCR (Catalog# MSB-1001, BIO-RAD)

Dung dịch màu cam SYPRO trong DMSO (SIGMA cat.-no. S5692-500UL), nồng độ "5000x"

Thiết bị đo: Đầu đọc: Hệ thống thời gian thực CFX384 (Bio-Rad)

Người máy theo tác với pipet: HamiltonStarlet

Dung dịch đệm thử nghiệm: 20mM Tris, 150mM NaCl pH7,5

Protein đích: STING ở người (hSTING, gốc 155-341, trình tự kiểu hoang với đầu tận N được gắn thẻ His8 và vị trí tách TEV, MW: 23601,5Da)

Dung dịch gốc protein: c = 309µM dung dịch gốc trong dung dịch đệm thử nghiệm

Nồng độ thử nghiệm cuối cùng của hợp chất thử nghiệm: 100uM, 3uM protein đích, "5x" SYPR Orange

Quy trình thử nghiệm:

- 1) Dung dịch gốc chứa hợp chất và dung dịch pha loãng của nó được điều chế trong dung dịch đệm thử nghiệm
 - 2) 5ul dung dịch gốc nhuộm huỳnh quang (5000x SYPRO Orange) được trộn với 50ul protein đích (309uM) và 945ul dung dịch đệm.
 - 3) 2ul hỗn hợp nhuộm protein (25x SYPRO Orange và 15uM Protein) được bổ sung vào 8ul dung dịch hợp chất. Thể tích cuối cùng là 10uL.
 - 4) Một vài vị trí lỗ nhất định được dùng làm đối chứng âm.
 - 5) Các đĩa được điều chế để đo lặp lại và ly tâm trong 2 phút với tốc độ 1000g.
 - 6) Trong khi đo, sử dụng 160 vòng 0,5 °C (độ dốc nhiệt độ 15s/vòng, 15 °C đến 95 °C).
- Phân tích dữ liệu: Đường công phân ly được xử lý trong phần mềm quản lý Bio-Rad CFX. Loại đỉnh được đặt về "âm tính". Trong trường hợp của Ví dụ 1.1, Ví dụ 2.1 và Ví dụ 4.1, ít nhất hai kết quả đo Tm được lấy trung bình.

Sự thay đổi về Tm được xác định và được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Độ dịch chuyển Tm hSTING

Ví dụ	Độ dịch chuyển Tm hSTING [°C]
1,1	16,1
1,2	12,0
2,1	23,6
2,2	15,0
3,1	17,0
3,2	9,0
4,1	13,9
4,2	9,0
ML-RR-CDA·2Na ⁺ (Hợp chất 21 trong WO 2014/189805)	12,0

Hoạt tính với tế bào của hợp chất theo sáng chế có thể được chứng minh bằng cách sử dụng thử nghiệm THP1 *in vitro* sau:

Sự cảm ứng xytokin *in vitro*

Hoạt tính cảm ứng xytokin của hợp chất theo sáng chế đã được chứng minh bằng cách sử dụng dòng tế bào thông báo THP1.

Việc hoạt hoá protein STING được biểu hiện trên các dòng tế bào làm tăng việc sản xuất interferon. Bằng việc tích hợp ổn định cấu trúc thông báo SEAP (phosphatase kiềm của phôi được tiết) kích thích được bằng yếu tố điều hòa interferon (IRF), có thể theo dõi con đường truyền tín hiệu interferon theo chức năng. Bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym đo màu Invivogen's QUANTI-Blue™ và thiết bị đọc mật độ thích hợp (optical density-OD), có thể đo và định lượng hoạt tính của SEAP. Kỹ thuật này có thể được sử dụng để nhận biết đặc điểm sự biến đổi được lý của protein STING.

Việc đo hoạt tính SEAP được tiến hành trên tế bào THP1-Blue ISG biểu hiện ổn định protein STING ở người và cấu trúc thông báo SEAP kích thích được bằng IRF. Các tế bào được nuôi cấy để phát triển trong môi trường RPMI1640 với 10% huyết thanh bào thai bê, 50 µg/ml Penicillin-Streptomycin, 100µg/ml Zeocin, và 100µg/ml Normocin

trong tủ áp ở 37°, độ ẩm 95% và 5% CO₂. Các tế bào sẵn sàng để thử nghiệm được bảo quản dưới dạng nguồn đông lạnh.

Để chuẩn bị cho thử nghiệm, các tế bào được rã đông trong môi trường không chứa Zeocin-/Normocin và được phân bố vào đĩa thử nghiệm với mật độ 15.000 tế bào/15 µL trên mỗi lỗ. Các hợp chất được điều chế bằng cách pha loãng theo dãy 8 hoặc 16 điểm trong dung dịch nước DMSO 50% và bước pha loãng cuối cùng vào môi trường để đảm bảo nồng độ DMSO cuối cùng là 0,5% trong thử nghiệm. 5 µL hợp chất đã pha loãng và 5 µL môi trường được bổ sung vào đĩa, tiếp theo là ủ 24 giờ ở 37°C.

Vào ngày thử nghiệm, chất phản ứng Quanti Blue được bổ sung với lượng 75 µl trên mỗi lỗ vào tất cả các lỗ của đĩa và đĩa được ủ trong 30 phút nữa ở 37°C. OD ở 620 nm được đo trên thiết bị đọc EnVision (PerkinElmer).

Trị số EC₅₀ và độ dốc Hill được suy ra từ việc hiệu chỉnh đường cong không tuyến tính bốn thông số 8- hoặc 16-điểm với phần mềm Megalab (Boehringer Ingelheim) bằng cách sử dụng OD ở 620 nM. Trị số EC₅₀ của Ví dụ 1,1, Ví dụ 2.1, Ví dụ 3.1 và Ví dụ 4.1 là kết quả trung bình của ít nhất hai kết quả đo. Xem Bảng 2.

Bảng 2: Trị số EC₅₀

Ví dụ	EC ₅₀ [µM]
1,1	0,21
1,2	5,8
2,1	0,05
2,2	0,79
3,1	0,17
3,2	8,5
4,1	0,19
4,2	6,2
ML-RR-CDA·2Na ⁺ (Hợp chất 21 trong WO 2014/189805)	0,65

Trong thử nghiệm THP1 nêu trên, Ví dụ 1.1 là công hiệu hơn chất đồng phân không đối quang Ví dụ 1.2 tương ứng. Phổ nhiễu xạ tia của Ví dụ 1.1 trong phức với

STING ở người cho thấy rằng cả hai nguyên tử phospho cùng có cấu hình Rp. Theo kiểu tương tự, do đó, có thể giả thiết chất đồng phân không đối quang tương ứng của Ví dụ 2.1, Ví dụ 3.1, Ví dụ 4.1 công hiệu hơn cũng có cấu hình Rp ở cả hai nguyên tử phospho.

Một vài kiểu đa hình nucleotit đơn đã được nhận diện trong gen STING ở người mà có thể làm ảnh hưởng đến đáp ứng với dinucleotit dạng vòng. Để xác định hoạt tính của hợp chất theo sáng chế, dòng tế bào thông báo THP1-BLUE ISG biểu hiện các biến thể STING ở người khác nhau đã được tạo ra. Để thực hiện, STING nội sinh ở người đầu tiên được xóa bằng cách sử dụng hệ CRISPR/CAS9: tế bào THP1-Blue ISG được dòng điện dịch chuyển với plasmid ALL-IN-ONE CRISPR hướng đích gen STING (được mua từ Sigma mã hoá gRNA và GFP làm gen thông báo về việc tải nạp thành công). Tiếp theo, tế bào GFP dương tính được phân loại 24h sau khi chuyển nhiễm và giãn nở. Tiếp theo, các tế bào được phân tán vào môi trường methocel bán rắn để cho phép việc tách dòng tế bào vô tính. Tiếp theo, dòng vô tính được sàng lọc về khả năng đáp ứng cGAMP bằng cách sử dụng thử nghiệm thông báo Quanti blue. tiếp theo, dòng vô tính không đáp ứng được phân tích về độ hao hụt STING bằng thử nghiệm thấm Tây và sắp xếp trình tự của ô gen STING.

Để biểu hiện quá mức các biến thể STING ở người, dòng vô tính THP1-Blue ISG hSTING KO đã xác nhận được tải nạp bằng plasmid retrovirus riêng rẽ (MSCV-ires-GFP-Blasti) mã hoá các biến thể alen của hSTING (WT, HAQ, R232H, AQ và R293Q). Các tế bào đã biến nạp được phân loại về mức độ khác nhau của lượng huỳnh quang GFP và biểu hiện alen STING được phân tích bằng thử nghiệm thấm Tây. Quần thể biểu hiện protein STING lệch (WT, HAQ, R232H, AQ và R293Q) với lượng so sánh được với lượng STING nội sinh tạo thành dòng tế bào THP1-Blue ISG chưa biến đổi gốc được chọn và được sử dụng để ác định đặc điểm CDN. Các ví dụ của sáng chế thể hiện hoạt tính tế bào trong cả năm biến thể nêu trên.

Độ ổn định tế bào của hợp chất theo sáng chế được đo như sau: Hợp chất được hoà tan trong môi trường nuôi cấy tế bào (cell culture môi trường-MEM được bổ trợ 10% FCS, 1% axit amin không thiết yếu và 1% pyruvat) đến nồng độ cuối cùng 10 μ M và ủ

với dòng tế bào biểu mô Calu-3 phổi người (60.000 tế bào/lỗ trong đĩa 24 lỗ) trong thời gian lên đến 24 h. Mẫu của dịch nổi nuôi cấy tế bào được lấy vào thời điểm 1, 6, 24 giờ và định lượng trong LC-MS/MS.

PK trên chuột của hợp chất theo sáng chế được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sau:

PK trên chuột

Động vật thử nghiệm

Các hợp chất được hoà tan trong dung dịch NaCl sinh lý và được dùng trong tĩnh mạch cho chuột C57BL/6NRj đực với liều lượng 10 $\mu\text{mol/Kg}$. Các mẫu máu 20 μL được lấy vào thời điểm 0,25, 0,5, 0,75, 1 và 2 h bằng cách dùng EDTA làm chất chống đông. Huyết tương máu được tạo ra bằng cách ly tâm và bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nồng độ hợp chất được xác định bằng LC-MS/MS. Quan hệ nồng độ-thời gian được xác định (kết quả trung bình của các thử nghiệm lặp) được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3:

Ví dụ	T = 0,25 h	T = 0,5 h	T = 0,75 h	T = 1 h	T = 2 h
1,1	3080 nM	1200 nM	550 nM	249 nM	120 nM
2,1	1970 nM	699 nM	401 nM	241 nM	78 nM
3,1	2710 nM	1280 nM	595 nM	260 nM	111 nM

Do đó, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức chung I dùng để làm thuốc.

Ngoài ra, sáng chế bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức chung I hoặc được phẩm theo sáng chế để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng mà có thể bị ảnh hưởng bởi việc điều hoà STING ở bệnh nhân hoặc bệnh hoặc tình trạng liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING ở bệnh nhân. Bệnh nhân được ưu tiên là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng liên quan đến hoặc điều hoà được bằng STING ở động vật có vú cần điều trị,

phương pháp bao gồm bước dùng cho đối tượng bị bệnh, tốt hơn là người, cần được điều trị một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất hoặc được phẩm theo sáng chế.

Các bệnh và tình trạng mà có liên quan hoặc điều hoà được bằng, hoặc có thể bị ảnh hưởng bởi việc điều hoà STING bao gồm bệnh viêm, dị ứng hoặc tự miễn, ví dụ, viêm mũi dị ứng hoặc hen, bệnh truyền nhiễm hoặc ung thư. Ngoài ra, do hoạt tính của chúng, hợp chất theo sáng chế là thích hợp làm tá dược vaccin.

Các bệnh tự miễn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, luput ban đỏ hệ thống. Psoriasis, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin (insulin-dependent diabetes mellitus- IDDM), bệnh viêm bì cơ và hội chứng Sjogren's (Sjogren's syndrome-SS).

Bệnh viêm là nhóm có các đáp ứng với chấn thương mạch máu, tế bào và thần kinh. Bệnh viêm có thể xác định đặc điểm dưới dạng sự di chuyển của các tế bào viêm như bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu trung tính và bạch cầu hạt vào mô. Quá trình này thường kết hợp với việc giảm chức năng hàng rào nội mô và việc phù đi vào mô. Bệnh viêm có thể được phân loại thành cấp tính hoặc mạn tính. Viêm cấp tính là đáp ứng ban đầu của cơ thể với các kích thích có hại và đạt được bằng cách gia tăng sự chuyển động của huyết tương và bạch cầu từ máu vào mô bị thương. Dòng thác hiện tượng hóa sinh nhân giống và làm chín đáp ứng viêm, bao gồm hệ mạch cục bộ, hệ miễn dịch, và các tế bào khác nhau bên trong mô bị thương. Bệnh viêm kéo dài, đã biết là viêm mạn tính, dẫn đến sự dịch chuyển tích lũy về loại tế bào mà xuất hiện tại vị trí viêm và được xác định đặc điểm bằng cách phá hủy và sửa chữa đồng thời các mô trong quá trình viêm.

Khi việc xuất hiệ là một phần của đáp ứng miễn dịch với bệnh nhiễm trùng hoặc ở dạng đáp ứng cấp tính với chấn thương, bệnh viêm có thể có lợi và thường là tự giới hạn. Tuy nhiên, bệnh viêm có thể bất lợi trong một số tình trạng bệnh. Quá trình này bao gồm việc sản xuất việc viêm quá mức để đáp ứng với tác nhân lây nhiễm, mà có thể dẫn đến sự tổn thương cơ quan nghiêm trọng và chết (ví dụ, trong trường hợp nhiễm trùng huyết). Ngoài ra, viêm mạn tính thường có hại và là nguyên nhân của vô số bệnh mạn tính, gây ra các tổn thương mô nghiêm trọng và không thể chữa trị được. Trong các

trường hợp đó, đáp ứng miễn dịch thường trực tiếp chống lại chính các mô (tự miễn dịch), mặc dù đáp ứng mạn tính với dị nguyên cũng có thể dẫn đến sự tổn thương vô tình cho chính các mô. Do đó, mục đích của phép trị liệu kháng viêm làm giảm bệnh viêm này, để ức chế sự tự miễn khi xuất hiện và cho phép phát triển các quá trình sinh lý hoặc làm lành và sửa chữa mô.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm bất kỳ của các mô và cơ quan của cơ thể, bao gồm viêm cơ xương, viêm mạch máu, viêm thần kinh, viêm hệ tiêu hóa, viêm mắt, viêm của hệ sinh sản, và các bệnh viêm khác, như được ví dụ dưới đây.

Viêm cơ xương dùng để chỉ tình trạng viêm bất kỳ của hệ cơ xương, đặc biệt là các tình trạng bệnh ảnh hưởng đến khớp xương, bao gồm khớp tay, cổ tay, khuỷu tay, vai, hàm, cột sống, cổ, hông, gối, cổ chân, và chân, và các tình trạng bệnh ảnh hưởng đến mô nối cơ với xương như gân. Các ví dụ về viêm cơ xương mà có thể điều trị được bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm bệnh viêm khớp (bao gồm, ví dụ, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vảy nến, viêm cột sống dính khớp, viêm khớp nhiễm khuẩn cấp và mạn tính, viêm khớp kết hợp với gut và giả gut, và viêm khớp tự phát thiếu niên), viêm gân, thoái hóa khớp, thoái hóa khớp gân, viêm bao hoạt dịch, viêm xơ (đau cơ xơ hóa), viêm lõi cầu trên ngoài, suy thoái cơ, và viêm xương (bao gồm, ví dụ, bệnh Paget, viêm xương pubis, và viêm xương sợi bọc). Viêm mắt dùng để chỉ bệnh viêm tổ chức bất kỳ của mắt, bao gồm mi mắt. Các ví dụ về viêm mắt mà có thể điều trị được bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm bệnh viêm mí mắt, sa da mí, viêm kết mạc, viêm tuyến lệ, viêm tuyến lệ, viêm kết-giác mạc khô (bệnh khô mắt), viêm màng cứng mắt, biến dạng mí mắt, và viêm màng bồ đào. Các ví dụ về viêm của hệ thần kinh mà có thể điều trị được bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm viêm não, hội chứng Guillain-Barre, viêm màng não, bệnh tăng trương lực cơ thần kinh, chứng ngủ rũ, bệnh xơ cứng rải rác, viêm tủy và tâm thần phân liệt.

Các ví dụ về bệnh viêm của hệ bạch huyết hoặc mạch mà có thể điều trị được bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm xơ cứng khớp, viêm khớp, viêm tĩnh mạch, viêm mạch, và viêm mạch bạch huyết.

Các ví dụ về tình trạng viêm của hệ tiêu hóa mà có thể điều trị được bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm viêm ống mật, viêm túi mật, viêm ruột, viêm ruột hoại tử, viêm dạ dày, viêm dạ dày ruột, bệnh viêm loét đại tràng (như bệnh Crohn và viêm loét đại tràng), viêm hồi tràng trên heo, và viêm niêm mạc trực tràng.

Các ví dụ về tình trạng viêm của hệ sinh sản mà có thể điều trị được bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm viêm cổ tử cung, viêm màng ối, viêm nội mạc tử cung, viêm mào tinh hoàn, viêm rốn, viêm buồng trứng, viêm tinh hoàn, viêm ống dẫn trứng, áp xe vòi-buồng trứng, viêm niệu đạo, viêm âm đạo, viêm âm hộ, và đau mãn tính ở âm hộ.

Các chất có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh tự miễn có thành phần viêm. Các tình trạng bệnh này bao gồm hội toàn phần phát tán cấp tính, bệnh Behcet, bệnh Chagas, hội chứng mệt mỏi mạn tính, rối loạn hệ thống thần kinh thực vật, viêm não tủy, viêm cột sống dính khớp, thiếu máu bất sản tủy, viêm tuyến mô hôi mưng mủ, viêm gan tự miễn, viêm buồng trứng tự miễn, bệnh không dung nạp gluten, bệnh Crohn, bệnh đái tháo đường typ 1, viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh kháng màng đáy cầu thận. Bệnh Graves, hội chứng Guillain-Barré, bệnh Hashimoto, bệnh ban xuất huyết Henoch-Schonlein (Henoch-Schonlein purpura), bệnh Kawasaki, luput ban đỏ, viêm đại tràng vi thể, viêm đa động mạch vi thể, thương tổn mô liên kết kết hợp, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh nhược cơ, hội chứng co giật mắt theo nhiều hướng, viêm thần kinh thị giác, bệnh viêm tuyến giáp, bệnh pemphigut, viêm đa động mạch nút, đau đa cơ, bệnh viêm khớp dạng thấp, hội chứng Reiter, hội chứng Sjogren, bệnh viêm động mạch thái dương, bệnh bạch cầu hạt Wegener, bệnh thiếu máu huyết tán tự miễn kháng thể ấm, bệnh viêm bàng quang kẽ, bệnh lyme, xơ cứng bì khu trú, bệnh vẩy nến, bệnh u hạt, bệnh cứng da, viêm loét đại tràng, và bệnh bạch biến.

Các chất có thể được sử dụng để điều trị bệnh quá mẫn qua trung gian tế bào T có thành phần viêm. Các tình trạng bệnh này bao gồm quá mẫn tiếp xúc, viêm da tiếp xúc (bao gồm cả bệnh do cây thường xuân độc), chứng mề đay, dị ứng da, dị ứng hô hấp (sốt cỏ khô, viêm mũi dị ứng) và bệnh không dung nạp gluten (bệnh Celliac).

Các tình trạng viêm khác mà có thể điều trị được bằng các chất bao gồm, ví dụ, viêm ruột thừa, viêm da, bệnh viêm bì cơ, viêm nội tâm mạc, viêm xơ, bệnh viêm nước, viêm lưỡi, viêm gan, viêm tuyến mồ hôi mưng mủ, viêm móng mắt, viêm thanh quản, viêm tuyến sữa, viêm cơ tim, viêm thận, viêm tai, viêm tụy, bệnh quai bị, bệnh đau khớp lupus, viêm phúc mạc, viêm họng, viêm màng phổi, viêm phổi, viêm tuyến tiền liệt, viêm thận, và bệnh loét miệng, thải loại mảnh ghép (bao gồm các cơ quan như thận, gan, tim, phổi, tụy (ví dụ, tế bào tiểu đảo), tủy xương, giác mạc, ruột non, ghép da, đồng ghép da, và ghép van tim, bệnh huyết thanh, và bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ), viêm tụy cấp tính, viêm tụy mạn tính, hội chứng suy hô hấp cấp. Hội chứng Sexary, tăng sản thượng thận bẩm sinh, viêm tuyến giáp không nung mủ, tăng canxi huyết kết hợp với ung thư, bệnh pemphigus, viêm da dạng herpes bóng nước, hồng ban đa dạng nghiêm trọng, viêm da bong vảy, viêm da dầu, viêm mũi dị ứng quanh năm hoặc theo mùa, hen phế quản, viêm da tiếp xúc, viêm da tạng dị ứng, phản ứng mẫn cảm với thuốc, viêm kết mạc dị ứng, viêm giác mạc, zona mắt, viêm móng mắt và oiridocyclitis, viêm màng mạch võng mạc, viêm thần kinh thị giác, bệnh u hạt triệu chứng, hóa trị liệu bệnh lao rải rác hoặc dữ dội, giảm tiểu cầu tự phát ở người lớn, bệnh giảm tiểu cầu thứ cấp ở người lớn, bệnh thiếu máu do tan huyết mắc phải (tự miễn), bệnh bạch cầu và bệnh u lympho ở người lớn, bệnh bạch cầu cấp tính ở trẻ em, viêm ruột khu trú, viêm mạch tự miễn, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm tắc phổi mạn tính, thải loại mảnh ghép cơ quan rắn, nhiễm trùng huyết. Các điều trị được ưu tiên bao gồm điều trị thải loại mảnh ghép, bệnh viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vảy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh hen, bệnh viêm loét đại tràng, luput ban đỏ hệ thống, bệnh vảy nến, bệnh viêm phổi mạn tính, và viêm đi kèm các tình trạng bệnh nhiễm trùng (ví dụ, nhiễm trùng huyết).

Theo một khía cạnh, bệnh hoặc tình trạng được điều trị bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế là ung thư. Các ví dụ về ung thư bệnh và tình trạng trong đó hợp chất

có công thức I, hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó có thể có tác dụng điều trị khối u tiềm tàng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư phổi, xương, tụy, da, đầu, cổ, nội mạc tử cung, buồng trứng, dạ dày, đại tràng, vú, thực quản, ruột non, ruột, hệ nội tiết, tuyến giáp, bàng quang, tuyến thượng thận, niệu đạo, tuyến tiền liệt, dương vật, tinh hoàn, niệu quản, bàng quang, thận hoặc gan; ung thư trực tràng; ung thư vùng hậu môn; canxinom của ống dẫn trứng, nội mạc tử cung, cổ tử cung, âm đạo, âm hộ, bề thận, tế bào thận; sacôm mô mềm; myxoma; u cơ vân; u xơ; u mỡ; u quái; ung thư đường mật; u nguyên bào gan; sacôm mạch máu; u máu; ung thư gan nguyên phát; sacôm xơ; sacôm sụn; đa u tủy xương; bệnh bạch cầu mạn tính hoặc cấp tính; u bạch huyết lympho; u bạch huyết CNS sơ cấp; các khối u của CNS; các khối u cột sống; canxinom tế bào vảy; sacôm hoạt dịch; u trung biểu mô màng phổi ác tính; u thần kinh đệm thân não; u tuyến yên; u tuyến phế quản; u mô thừa sụn; u trung biểu mô; bệnh Hodgkin hoặc tổ hợp gồm một hoặc nhiều bệnh ung thư nêu trên.

Các bệnh ung thư được ưu tiên, mà có thể điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, là ung thư da, phổi, gan, ruột kết, não, vú, buồng trứng, tuyến tiền liệt, tụy, thận, dạ dày, đầu, cổ và ung thư tế bào chuyển tiếp xâm lấn, cũng như u lympho và bệnh bạch cầu.

Các hợp chất mới có thể được sử dụng để phòng ngừa, điều trị ngắn hoặc dài ngày các bệnh nêu trên, tùy ý với cả phẫu thuật, hóa trị liệu hoặc các hợp chất của tình trạng kỹ thuật khác, như ví dụ, chất kìm tế bào hoặc chất gây độc tế bào, chất ức chế tăng sinh tế bào, chất chống tạo mạch, steroid hoặc kháng thể.

Trong vai trò của chúng làm chất bổ trợ, theo các phương án nhất định, hợp chất và được phẩm theo sáng chế có thể được dùng làm chất bổ trợ trong chiến lược trị liệu hoặc dự phòng sử dụng vaccin. Do vậy, CDN gần như tinh khiết theo sáng chế, hoặc tiền được chất hoặc muối được dụng của nó, có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều vaccin được chọn để kích thích đáp ứng miễn dịch với một hoặc nhiều kháng nguyên xác định trước. CDN gần như tinh khiết theo sáng chế, hoặc tiền được chất hoặc muối được dụng của nó, có thể được dùng cùng với, hoặc bổ sung cho, các vaccin này.

Các vaccin này có thể bao gồm vi khuẩn bất hoạt hoặc được làm giảm độc lực hoặc virus bao gồm kháng nguyên quan tâm, kháng nguyên đã tinh chế, virus hoặc vi khuẩn sống phân phối các vật truyền được tạo ra theo công nghệ tái tổ hợp để biểu hiện và/hoặc tiết kháng nguyên, vật truyền chứa tế bào trình diện kháng nguyên (APC) bao gồm tế bào đã được nạp kháng nguyên hoặc chuyển nhiễm với được phẩm bao gồm axit nucleic mã hoá kháng nguyên này, chất dẫn thuốc phân phối kháng nguyên liposom, hoặc vật truyền axit nucleic trần mã hoá kháng nguyên này. Danh sách này không chỉ bị giới hạn ở đây. Để làm ví dụ, vaccin này còn có thể bao gồm tế bào khối u bất hoạt biểu hiện và tiết một hoặc nhiều GM-CSF, CCL20, CCL3, IL-12p70, FLT-3 phối tử, xytokin.

Theo khía cạnh có liên quan, sáng chế đề cập đến các phương pháp gây ra, kích thích hoặc hỗ trợ đáp ứng miễn dịch ở cá thể. Các phương pháp này bao gồm bước cho dùng CDN gần như tinh khiết theo sáng chế, hoặc tiền được chất hoặc muối được dùng của nó, cho cá thể.

Khoảng liều của hợp chất có công thức chung (I) áp dụng được trong mỗi ngày thường nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10 mg, ví dụ, từ 0,001 đến 1 mg. Mỗi đơn vị liều có thể chứa một cách thuận lợi từ 0,0001 đến 10 mg, ví dụ, từ 0,001 đến 1 mg.

Lượng hữu hiệu điều trị thực tế hay liều điều trị tất nhiên sẽ tùy thuộc vào các yếu tố mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết như độ tuổi và thể trọng của bệnh nhân, đường dùng và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Trong trường hợp bất kỳ, hợp chất hoặc chế phẩm sẽ được dùng ở các liều lượng và theo cách cho phép một lượng có tác dụng điều trị cần được phân phối dựa trên tình trạng duy nhất của bệnh nhân.

Hợp chất, dược phẩm, bao gồm tổ hợp bất kỳ với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung, theo sáng chế có thể được dùng qua niêm mạc (ví dụ, theo đường uống, đường dưới lưỡi, đường âm đạo, đường mũi, cổ tử cung, v.v.), trong khối u, quanh khối u, qua da, hít, hoặc đường ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, dùng dưới da, trong tĩnh mạch, trong bắp, trong động mạch, trong da, nội tủy mạc và ngoài màng cứng). Trong phần lớn các

trường hợp, một trong số các đường dùng trong tĩnh mạch, trong khối u, quanh khối u hoặc dưới da là thích hợp.

Dược phẩm

Với mục đích của sáng chế, dược phẩm có thể được dùng theo nhiều cách bao gồm không phải ngoài đường tiêu hoá, ngoài đường tiêu hoá, bằng cách hít, tại chỗ, hoặc trực tràng trong chế phẩm chứa chất mang, chất hỗ trợ và chất dẫn thuốc được dùng. Việc dùng trong khối u (trực tiếp vào khối u) hoặc quanh khối u (xung quanh khối u) của hợp chất theo sáng chế có thể trực tiếp hoạt hoá việc thâm nhập infiltrating DC tại chỗ, trực tiếp thúc đẩy việc chết theo lập trình của tế bào khối u hoặc làm cho tế bào khối u nhạy với chất gây độc tế bào.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng chế phẩm tiêm vô trùng, như hỗn dịch nước hoặc dầu tiêm vô trùng. Hỗn dịch này có thể được bào chế theo lĩnh vực đã biết bằng cách sử dụng các chất làm phân tán hoặc thấm ướt thích hợp và các chất tạo hỗn dịch nêu trên. Chế phẩm tiêm vô khuẩn cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù tiêm vô khuẩn trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc, sử dụng được theo đường ngoài tiêu hóa, như dung dịch trong 1,3-butan-diol hoặc được bào chế dưới dạng bột đông khô nhanh. Trong số các chất dẫn thuốc và dung môi chấp nhận được mà có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, các dầu cố định vô khuẩn thông thường có thể được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường huyền phù hóa. Nhằm mục đích này, dầu ôn hòa, cố định bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm các mono hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, axit béo như axit oleic cũng có thể được sử dụng trong việc bào chế các chế phẩm tiêm.

Chế phẩm thích hợp để dùng khu trú trong miệng bao gồm viên ngậm bao gồm hoạt chất trong nền tạo hương, thường là sucroza và acaxia hoặc tragacanth; viên hình thoi bao gồm hoạt chất trong nền trơ như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và acaxia; và nước miệng bao gồm hoạt chất trong chất mang lỏng thích hợp.

Các chế phẩm để dùng theo đường âm đạo có thể ở dạng thuốc đặt âm đạo, băng vệ sinh dạng que, kem, gel, hồ nhão, bột, hoặc chế phẩm phun chứa thêm các chất, ngoài thành phần hoạt tính, như các chất mang đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là thích hợp.

Chế phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hoá bao gồm dung dịch tiêm vô trùng đẳng trương trong nước hoặc không chứa nước, có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm khuẩn, và dung dịch khiến cho chế phẩm có tính đẳng trương với máu của người nhận dự định, và hỗn dịch vô trùng chứa nước hoặc không chứa nước có thể bao gồm chất tạo hỗn dịch và chất làm đặc. Các chế phẩm có thể được chứa trong đồ chứa bịt kín ở dạng liều đơn vị hoặc đa liều, ví dụ, ampun và ống thuốc tiêm, và có thể bảo quản trong điều kiện sấy khô lạnh (đông khô nhanh) mà chỉ đòi hỏi việc bổ sung chất mang lỏng tiệt trùng, ví dụ, nước để tiêm, ngay trước khi sử dụng. Dung dịch và hỗn dịch tiêm có thể được điều chế từ các loại bột, thuốc cốm và viên nén tiệt trùng được mô tả trên đây.

Điều trị phối hợp

Hợp chất theo sáng chế có thể trực tiếp hoặc có thể được kết hợp với tá dược được dụng, với lượng đủ để gây ra, cải biến, hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch phù hợp. Đáp ứng miễn dịch can bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, cả hai đáp ứng đặc hiệu và không đặc hiệu, đáp ứng bẩm sinh, đáp ứng miễn dịch sơ cấp, sự miễn dịch thích ứng, đáp ứng miễn dịch thứ cấp, đáp ứng miễn dịch trí nhớ, hoạt hoá tế bào miễn dịch, tăng sinh tế bào miễn dịch, biệt hoá tế bào miễn dịch, và biểu hiện xytokin. Theo phương án nhất định, hợp chất và dược phẩm của nó được mô tả trong bản mô tả này là được dùng kết hợp với một hoặc nhiều dược phẩm bổ sung bao gồm vacxin dự định để kích thích đáp ứng miễn dịch cho một hoặc nhiều kháng nguyên xác định trước; chất bổ trợ; CTLA-4 và chất đối kháng con đường PD-1, lipit, liposom, tác nhân hoá trị liệu, dòng tế bào điều biến miễn dịch, v.v..

Hợp chất và dược phẩm của nó được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng trước, sau, và/hoặc đồng thời với dược phẩm hoặc phương thức trị liệu hoặc dự phòng bổ sung. Các chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử đồng kích thích B7,

intolokin-2, interferon-g, GM-CSF, chất đối kháng CTLA-4, phối tử OX-40/OX-40, phối tử CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus bệnh đậu mùa, Bacille Calmette-Guerin (BCG), liposom, phèn, tá dược Freund hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh, nội độc tố giải độc, dầu khoáng, các chất hoạt động bề mặt như lipolecithin, pluronic polyol, polyanion, peptit, và dầu hoặc nhũ tương hydrocacbon. Chất mang để gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào T mà nó kích thích ưu tiên đáp ứng tế bào T tiêu tế bào chống lại đáp ứng kháng thể được ưu tiên, mặc dù cũng có thể sử dụng các chất kích thích cả hai loại đáp ứng này. Trong trường hợp khi tác nhân là polypeptit, có thể được dùng chính polypeptit hoặc polynucleotit mã hoá polypeptit này. Chất mang có thể là tế bào, như tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell-APC) hoặc tế bào có tua. Tế bào trình diện kháng nguyên bao gồm các loại tế bào như đại thực bào, tế bào có tua và tế bào B. Các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp khác bao gồm bạch cầu đơn nhân to, tế bào Kupffer vùng mép, vi tế bào thần kinh đệm, tế bào Langerhans, tế bào có tua dạng xuyên thấu, tế bào có tua có nang, và tế bào T. Cũng có thể sử dụng tế bào trình diện kháng nguyên ngẫu nhiên. Các ví dụ về tế bào trình diện kháng nguyên tùy ý bao gồm tế bào hình sao, tế bào có nang, tế bào biểu mô và nguyên bào sợi. Chất mang có thể là tế bào vi khuẩn mà được biến nạp để biểu hiện polypeptit hoặc để phân phối polynucleotit mà tiếp theo được biểu hiện trong tế bào của cá thể đã được chủng ngừa. Chất bổ trợ, như nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, có thể bổ sung để làm tăng khả năng của vacxin để khơi mào, làm tăng, hoặc kéo dài đáp ứng miễn dịch. Các nguyên liệu bổ sung, như xytokin, chemokin, và trình tự axit nucleic của vi khuẩn, như CpG, chất chủ vận thụ thể kiểu toll (TLR) 9 cũng như các chất chủ vận bổ sung cho TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, bao gồm lipoprotein, LPS, monophosphoyl lipid A, axit lipoteichoic, imiquimod, resiquimod, và thêm vào đó chất chủ vận gen kích thích axit retinoic I (RIG-I) như poly I:C, được sử dụng riêng biệt hoặc trong tổ hợp với dược phẩm đã mô tả cũng là chất bổ trợ tiềm năng. Các ví dụ đại diện về chất bổ trợ bao gồm các tá dược tổng hợp QS-21 chứa saponin đồng nhất được tinh chế từ cỏ cây *Quillaja saponaria* và *Corynebacterium parvum* (McCune et al., Cancer, 1979; 43:1619).

Phương pháp dùng đồng thời với tác nhân trị liệu bổ sung là đã biết rõ trong lĩnh vực này (Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological

Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA). Thông thường, việc dùng đồng thời hoặc dùng cùng với các chỉ định điều trị đối tượng với hai hoặc nhiều tác nhân, trong đó các tác nhân này có thể được dùng đồng thời hoặc vào các thời điểm khác nhau. Ví dụ, các tác nhân này có thể được dùng cho một đối tượng dưới dạng dùng riêng rẽ, mà có thể về cơ bản cùng hoặc khác thời điểm, và mà có thể qua đường dùng giống hoặc khác nhau. Các tác nhân này có thể được dùng cho một đối tượng trong một lần dùng (ví dụ, cùng chế phẩm) sao cho chúng được dùng cùng một thời điểm qua cùng đường dùng.

Bởi vì các đặc tính tá dược của hợp chất theo sáng chế, chúng còn có thể được dùng kết hợp với phương thức trị liệu khác bao gồm các vacxin, chất bổ trợ, kháng nguyên, kháng thể, và chất điều biến miễn dịch khác. Các ví dụ được trình bày dưới đây.

Tá dược

Ngoài hợp chất theo sáng chế và dược phẩm của nó được mô tả trong bản mô tả này, dược phẩm hoặc các phương pháp của sáng chế còn có thể bao gồm một hoặc nhiều chất bổ sung mà, vì bản chất của chúng, có thể có vai trò kích thích hoặc theo cách khác sử dụng hệ miễn dịch để đáp ứng lại kháng nguyên ung thư có mặt trên tế bào khối u đích. Chất bổ trợ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lipit, liposom, vi khuẩn bất hoạt mà nó gây ra sự miễn dịch bẩm sinh (ví dụ, *Listeria monocytogenes* bất hoạt hoặc được làm giảm độc lực), dược phẩm làm trung gian cho việc hoạt hoá miễn dịch bẩm sinh qua thụ thể kiểu toll (TLRs), thụ thể kiểu (NOD) (NLRs), thụ thể kiểu (RIG)-I (RLRs) trên cơ sở gen kích thích được axit retinoic, thụ thể lectin typ C (CLRs) và/hoặc mẫu phân tử liên hợp mầm bệnh ("PAMPS"). Các ví dụ về PAMP bao gồm lipoprotein, lipopolypeptit, peptidoglycan, zymosan, lipopolysaccharit, neisserial porin, flagellin, profilin, galactoceramit, muramyl dipeptit. Peptidoglycans, lipoprotein, và axit lipoteichoic là hợp phần thành tế bào của Gram dương. Lipopolysaccharit được biểu hiện bởi hầu hết các vi khuẩn, với MPL là một ví dụ. Flagellin dùng để chỉ thành phần cấu trúc của đuôi râu vi khuẩn mà được tiết bởi các vi khuẩn gây bệnh và hội sinh.

Galactosylceramit là chất hoạt hoá tế bào T giết chết tự nhiên (NKT). Muramyl dipeptit là mô hình peptidoglycan hoạt động sinh học chung của toàn bộ các vi khuẩn.

Chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, như chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm chất đối kháng con đường CTLA-4, chất đối kháng con đường PD-1, chất đối kháng con đường Tim-3, chất đối kháng con đường Vista, chất đối kháng con đường BTLA, chất đối kháng con đường LAG-3, hoặc chất đối kháng con đường TIGIT. Theo một số phương án, chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng Tim-3, kháng thể kháng Vista, kháng thể kháng BTLA, kháng thể kháng LAG-3, hoặc kháng thể kháng TIGIT.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất đối kháng con đường CTLA-4. Theo một số phương án, tổ hợp này được sử dụng để điều trị khối u rắn hoặc u máu ác tính. CTLA-4 được cho là chất điều hòa âm tính quan trọng của đáp ứng miễn dịch thích ứng. Tế bào T được hoạt hóa điều hòa tăng CTLA-4, mà nó gắn kết CD80 và CD86 trên tế bào trình diện kháng nguyên với ái lực cao hơn CD28, do đó, ức chế sự kích thích tế bào T, sự biểu hiện gen IL-2 và sự tăng sinh tế bào T. Tác dụng kháng u của việc phong bế CTLA4 đã được quan sát thấy ở các mô hình chuột mắc carcinom trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt di căn, và u hắc tố di căn. Theo một số phương án, chất đối kháng con đường con đường CTLA-4 là phân tử kháng thể kháng CTLA-4 được chọn từ nhóm bao gồm tremelimumab và ipilimumab.

Ipilimumab (kháng thể CTLA-4, còn được biết là MDX-010, CAS số 477202-00-9) và tremelimumab (IgG2 kháng thể đơn dòng trước đây được biết là ticilimumab, CP-675,206) là kháng thể đơn dòng được nhân tính hóa mà nó gắn vào CTLA4 người và ngăn ngừa sự tương tác của nó với CD80 và CD86. Các chất điều biến miễn dịch âm tính khác mà có thể hướng đích bằng chiến lược tương tự bao gồm protein 1 gây chết tế bào theo chương trình (programmed cell death 1 - PD-1), chất làm giảm tế bào lympho

B và T, yếu tố tăng trưởng biến đổi beta, intolokin-10, và yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu.

Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng PD-1. Theo một phương án, tổ hợp này bao gồm phân tử kháng thể kháng PD-1, *ví dụ*, như được mô tả trong bản mô tả này, và kháng thể kháng CTLA-4, *ví dụ*, ipilimumab. Liều lượng *ví dụ* có thể sử dụng bao gồm liều lượng phân tử kháng thể kháng PD-1 nằm trong khoảng từ 1 đến 10 mg/kg, *ví dụ*, 3 mg/kg, và liều lượng kháng thể kháng CTLA-4, *ví dụ*, ipilimumab, khoảng 3 mg/kg.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất đối kháng con đường PD-1. Theo một số phương án, tổ hợp này được sử dụng để điều trị khối u rắn hoặc u máu ác tính. PD-1 là chất điều biến âm tính khác của đáp ứng miễn dịch thích ứng mà được biểu hiện trên tế bào T đã hoạt hoá. PD-1 gắn kết với B7-H1 và B7-DC, và sự ràng buộc của PD-1 triệt tiêu việc hoạt hoá tế bào T. Tác dụng kháng khối u đã được chứng minh bằng sự phong bế con đường PD-1. Phân tử kháng thể kháng PD-1 (*ví dụ*, Nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®), và pidilizumab), và AMP-224 đã được thông báo trong các tài liệu chuyên ngành là *ví dụ* về chất phong bế con đường PD-1 mà có thể hữu ích để sử dụng trong sáng chế. Theo một số phương án, chất đối kháng con đường PD-1 là phân tử kháng thể kháng PD-1 được chọn từ nhóm bao gồm nivolumab, pembrolizumab hoặc pidilizumab.

Theo một số phương án, chất đối kháng con đường PD-1 là immunoadhesin (protein giống kháng thể, *ví dụ*, immunoadhesin bao gồm tỷ phần gắn kết ngoại bào hoặc PD-1 của PD-L1 hoặc PD-L2 được dung hợp với vùng hằng định (*ví dụ*, vùng Fc của trình tự globulin miễn dịch). Theo một số phương án, chất ức chế PD-1 là AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; *ví dụ*, được bộc lộ trong WO2010/027827 và WO2011/066342) là thụ thể hòa tan PD-L2 Fc mà nó phong bế sự tương tác giữa PD-1 và B7-H1.

Theo một số phương án, chất đối kháng con đường PD-1 là chất ức chế PD-L1 hoặc PD-L2. Theo một số phương án, chất ức chế PD-L1 hoặc PD-L2 là kháng thể kháng

PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-L2. Theo một số phương án, chất ức chế kháng PD-L1 được chọn từ YW243,55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, hoặc MDX-1105. Theo một số phương án, chất ức chế PD-L1 là kháng thể kháng PD-L1 MSB0010718C. MSB0010718C (còn được gọi là A09-246-2; Merck Serono) là kháng thể đơn dòng gắn kết với PD-L1.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất đối kháng con đường TIM-3. Theo một số phương án, tổ hợp này được sử dụng để điều trị khối u rắn hoặc u máu ác tính. Theo một số phương án, chất đối kháng con đường TIM-3 là kháng thể kháng TIM-3. Theo một số phương án, kháng thể kháng TIM-3 phân tử được bộc lộ trong US 2015/0218274, công bố ngày 6 tháng 8 năm 2015, với tiêu đề “Antibody Molecules to TIM-3 and Uses thereof”.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất đối kháng con đường LAG-3. Theo một số phương án, tổ hợp này được sử dụng để điều trị khối u rắn hoặc u máu ác tính. Theo một số phương án, chất đối kháng con đường LAG-3 là kháng thể kháng LAG-3. Theo một số phương án, phân tử kháng thể kháng LAG-3 được bộc lộ trong US 2015/0259420, nộp ngày 13 tháng 3 năm 2015, với tiêu đề “Antibody Molecules to LAG-3 and Uses thereof”.

Dị hóa axit amin

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế chuyển hóa axit amin như chất ức chế IDO hoặc Arginase1 hoặc Arginase2 để gây đối kháng tác dụng ức chế miễn dịch cho tế bào miễn dịch ức chế miễn dịch như tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy xương.

Con đường truyền tín hiệu purin

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế con đường truyền tín hiệu purin như chất đối kháng con đường CD39 và CD73 hoặc chất ức chế thụ thể A2A/A2B.

Chemokin và thụ thể chemokin

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất đối kháng chemokin hoặc thụ thể chemokin để ức chế sự tuyển mộ các tế bào ức chế miễn dịch vào vi môi trường khối u. Ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng trong tổ hợp với chất đối kháng CCR2 hoặc CCR5 để làm giảm sự thâm nhập của tế bào ức chế tủy xương và tế bào T điều hòa.

Chất chủ vận thụ thể tế bào T

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất chủ vận thụ thể tế bào T, như chất chủ vận CD28, chất chủ vận OX40, chất chủ vận GITR, chất chủ vận CD137, chất chủ vận CD27 hoặc chất chủ vận HVEM.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất chủ vận CD27. Chất chủ vận CD27 làm ví dụ bao gồm chất chủ vận kháng thể kháng CD27, ví dụ, như được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO 2012/004367.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất chủ vận GITR. Theo một số phương án, tổ hợp này được sử dụng để điều trị khối u rắn hoặc u máu ác tính. Chất chủ vận GITR làm ví dụ bao gồm, *ví dụ*, protein dung hợp GITR và kháng thể kháng GITR (*ví dụ*, kháng thể kháng GITR hóa trị hai).

Chất chủ vận TLR

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất chủ vận thụ thể kiểu Toll. Thuật ngữ “thụ thể kiểu Toll” (hoặc “TLR”) như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ thành viên của họ thụ thể kiểu toll gồm các protein hoặc mảnh của nó có cảm giác sản phẩm vi khuẩn và/hoặc khơi mào đáp ứng miễn dịch thích ứng. Theo một phương án, TLR hoạt hoá tế bào có tua (DC). Thụ thể kiểu Toll (TLRs) là họ gồm các thụ thể nhận dạng mẫu mà đầu tiên được nhận diện là các chất cảm biến của hệ miễn dịch bẩm sinh mà nhận biết được mầm bệnh vi khuẩn. TLR bao gồm họ gồm các phân tử mở rộng màng được bảo toàn chứa vùng ngoại bào gồm các vùng lặp giàu leuxin, miền xuyên màng và miền TIR (Toll/IL-1R) nội bào. TLRs nhận biết cấu trúc riêng biệt trong vi sinh

vật, thường được gọi là “PAMPs” (mẫu phân tử liên hợp với mầm bệnh). Phối tử gắn kết vào TLRs yêu cầu dòng thác của các con đường truyền tín hiệu nội bào mà gây ra việc sản xuất các yếu tố có liên quan đến bệnh viêm và sự miễn dịch.

Chất chủ vận TLR đã biết trong lĩnh vực này và hữu ích để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau:

Pam3Cys, chất chủ vận TLR-1/2;

CFA, chất chủ vận TLR-2;

MALP2, chất chủ vận TLR-2;

Pam2Cys, chất chủ vận TLR-2;

FSL-1, chất chủ vận TLR-2;

Hib-OMPC, chất chủ vận TLR-2;

axit polyribosinic:polyriboxytidic (Poly I:C), chất chủ vận TLR-3;

axit polyadenosin-polyuridylic (poly AU), chất chủ vận TLR-3;

Axit Polyinosinic-Polycytidylic được làm ổn định bằng poly-L-lysin và carboxymethylxenluloza

(Hiltonol®), chất chủ vận TLR-3;

monophosphoyl lipit A (MPL), chất chủ vận TLR-4;

LPS, chất chủ vận TLR-4;

flagellin của vi khuẩn, chất chủ vận TLR-5;

sialyl-Tn (STn), carbohydrat kết hợp với muxin MUC1 ở một số người tế bào ung thư và chất chủ vận TLR-4;

imiquimod, chất chủ vận TLR-7;

resiquimod, chất chủ vận TLR-7/8;

loxoribine, chất chủ vận TLR-7/8; và

CpG dinucleotit (CpG-ODN) không metyl hóa, chất chủ vận TLR-9.

Vì chất lượng tá dược của chúng, tốt hơn nếu chất chủ vận TLR được sử dụng kết hợp với vaccin, chất bổ trợ và/hoặc chất điều biến miễn dịch khác, và có thể được kết hợp trong các tổ hợp khác nhau. Do vậy, theo các phương án nhất định, hợp chất mono- hoặc di-FCDN mà nó gắn vào STING và gây ra việc hoạt hoá TBK1 phụ thuộc STING

và tế bào khối u bất hoạt mà nó biểu hiện và tiết một hoặc nhiều xytokin mà nó kích thích sự cảm ứng, tuyển mộ và/hoặc chín của tế bào có tua, như được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cùng với một hoặc nhiều chất chủ vận TLR vì mục đích trị liệu.

Phép trị liệu kháng thể

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với phép kháng thể trị liệu. Theo một số phương án, cơ chế tác động của phép trị liệu kháng thể là gây độc tế bào bởi tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity-ADCC). ADCC là cơ chế bảo vệ miễn dịch qua trung gian tế bào nhờ đó tế bào thực hiện của hệ miễn dịch phân giải một cách tích cực tế bào đích, mà kháng nguyên màng-bề mặt của nó được gắn kết bằng kháng thể đặc hiệu. Đây là một trong số các cơ chế mà qua đó kháng thể, là một phần của đáp ứng miễn dịch ở người, có thể có vai trò giới hạn và chữa bệnh nhiễm trùng. ADCC cổ truyền được trung gian qua các tế bào giết chết tự nhiên (natural killer-NK); đại thực bào, bạch cầu trung tính và tế bào ưa eosin cũng có thể làm trung gian cho ADCC. ADCC là cơ chế tác động quan trọng của các kháng thể đơn dòng trị liệu, bao gồm trastuzumab và rituximab, chống lại khối u. Hợp chất theo sáng chế có thể hoạt động để làm cho ADCC có tiềm năng.

Dưới đây là danh sách các ví dụ các kháng thể mà có thể được sử dụng cùng với hợp chất theo sáng chế:

Muromonab-CD3, Infliximab, adalimumab, Omalizumab, Daclizumab, Rituximab, Ibritumomab, Tositumomab, Cetuximab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Lym-1 Ipilimumab, Vitaxin, Bevacizumab và Abciximab.

Các kháng thể trị liệu bổ sung mà có thể được sử dụng kết hợp với hợp chất theo sáng chế bao gồm chất ức chế thụ thể prolactin (PRLR), chất ức chế HER3, chất ức chế EGFR2 và/hoặc EGFR4, chất ức chế M-CSF, kháng thể kháng APRIL, hoặc kháng thể kháng SIRP□ hoặc kháng CD47.

Tác nhân hóa trị liệu

Theo các phương án bổ sung của các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, hợp chất theo sáng chế được sử dụng kết hợp với tác nhân hoá trị liệu (ví dụ, hợp chất được phân tử nhỏ). Do đó, các phương pháp còn bao gồm bước cho dùng cho đối tượng lượng có tác dụng trị liệu của một hoặc nhiều tác nhân hoá trị liệu làm chất điều trị hoặc tổ hợp điều trị bổ sung. Theo phương án nhất định, một hoặc nhiều tác nhân hoá trị liệu được chọn từ nhóm bao gồm abirateron axetat, altretamin, anhydrovinblastin, auristatin, bexaroten, bicalutamid, BMS 184476, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)benzen sulfonamid, bleomycin, N,N-dimethyl-L-valyl-L-valyl-N-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolin-t-butylamid, cachectin, cemadotin, chlorambucil, cyclophosphamid, 3',4'-didehydro-4'-deoxy-8'-norvin-calceculin, docetaxol, doxorubicin, cyclophosphamid, carboplatin, carmustin, cisplatin, cryptophycin, cyclophosphamid, cytarabin, dacarbazin (DTIC), dactinomycin, daunorubicin, decitabin, dolastatin, doxorubicin (adriamycin), etoposide, 5-fluorouracil, finasteride, flutamide, hydroxyurea và hydroxyureataxanes, ifosfamide, liarozole, lonidamin, lomustin (CCNU), enzalutamide, mechlorethamin (methyl nitros), melphalan, mivobulin isethionat, rhizoxin, sertenefer, streptozocin, mitomycin, methotrexat, taxanes, nilutamide, onapriston, paclitaxel, prednimustin, procarbazine, RPR109881, stramustine phosphat, tamoxifen, tasonermin, taxol, tretinoin, vinblastin, vincristin, vindesine sulfat, và vinorelbine.

Theo các phương án bổ sung của các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, hợp chất theo sáng chế được sử dụng kết hợp với tác nhân hoá trị liệu và/hoặc bổ sung tác nhân để điều trị các dấu hiệu như được mô tả trong các phương pháp trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm sotrastaurin, nilotinib, 5-(2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-N-ethyl-4-(4-(morpholinomethyl)phenyl)isoxazole-3-carboxamid, dactolisib, 8-(6-Methoxy-pyridin-3-yl)-3-methyl-1-(4-piperazin-1-yl-3-trifluoromethyl-phenyl)-1,3-dihydro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-on, 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)-1-(6-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)-1-methylurea, buparlisib, 8-(2,6-difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)-N-(4-((dimethylamino)methyl)-1H-imidazol-2-yl)quinoxaline-5-carboxamid, (S)-N1-(4-methyl-5-(2-(1,1,1-trifluoro-

metylpropan-2-yl)pyridin-4-yl)thiazol-2-yl)pyrrolidin-1,2-dicarboxamit, (S)-1-(4-clophenyl)-7-isopropoxy-6-metoxi-2-(4-(metyl-(((1r,4S)-4-(4-metyl-3-oxopiperazin-1-yl)xyclohexyl)metyl)amino)phenyl)-1,2-dihydroisoquinolin-3(4H)-on, deferasirox, letrozole, (4S,5R)-3-(2'-amino-2-morpholino-4'-(triflometyl)-[4,5'-bipyrimidin]-6-yl)-4-(hydroxymetyl)-5-metyloxazolidin-2-on, (S)-5-(5-clo-1-metyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)-6-(4-clophenyl)-2-(2,4-dimetoxypyrimidin-5-yl)-1-isopropyl-5,6-dihydropyrol[3,4-d]imidazol-4(1H)-on, 4-(((1R,2R)-2-hydroxycyclohexyl)amino)benzo[d]thiazol-6-yl)oxy)-N-metylpicolin-amit, imatinib mesylate, 2-flo-N-metyl-4-(7-(quinolin-6-ylmetyl)imidazo[1,2-b][1,2,4]triazin-2-yl)benzamid, ruxolitinib, panobinostat, osilodrostat, (S)-N-((S)-1-xyclohexyl-2-((S)-2-(4-(4-flobenzoyl)thiazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoetyl)-2-(metylamino)propanamid, (S)-N-((S)-1-xyclohexyl-2-((S)-2-(4-(4-flobenzoyl)thiazol-2-yl)pyrrolidin-1-yl)-2-oxoetyl)-2-(metylamino)propanamid, sonidegib phosphat, ceritinib, 7-xyclopentyl-N,N-dimetyl-2-((5-(piperazin-1-yl)pyridin-2-yl)amino)-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-6-carboxamid, N-(4-((1R,3S,5S)-3-amino-5-metylxyclohexyl)pyridin-3-yl)-6-(2,6-diflophenyl)-5-flopicolinamid, 2-(2',3-dimetyl-[2,4'-bipyridin]-5-yl)-N-(5-(pyrazin-2-yl)pyridin-2-yl)axetamid, encorafenib, 7-xyclopentyl-N,N-dimetyl-2-((5-((1R,6S)-9-metyl-4-oxo-3,9-diazabixyclo[4,2,1]-nonan-3-yl)pyridin-2-yl)amino)-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-6-carboxamid, binimetinib, midostaurin, everolimus, 1-metyl-5-((2-(5-(triflometyl)-1H-imidazol-2-yl)pyridin-4-yl)oxy)-N-(4-(triflometyl)phenyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-amin, pasi-reotide diaspartate, dovitinib, (R,E)-N-(7-clo-1-(1-(4-(dimetylamino)but-2-enoyl)azepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-metylisonicotinamid, N6-(2-isopropoxy-5-metyl-4-(1-metylpiperidin-4-yl)phenyl)-N4-(2-(isopropylsulfonyl)-phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin, 3-(4-(4-((5-clo-4-((5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)-5-flo-2-metylphenyl)piperidin-1-yl)thietan-1,1-dioxit, 5-clo-N2-(2-flo-5-metyl-4-(1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)piperidin-4-yl)phenyl)-N4-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-2,4-diamin, 5-clo-N2-(4-(1-etyl)piperidin-4-yl)-2-flo-5-metylphenyl)-N4-(5-metyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-2,4-diamin, valspodar, và vatalanib succinat.

Theo các phương án khác, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế PKC, chất ức chế BCR-ABL, chất ức chế HSP90, chất ức chế PI3K và/hoặc mTOR, chất ức chế FGFR, chất ức chế PI3K, chất ức chế FGFR, chất ức chế PI3K, chất ức chế sắc tố tế bào P450 (ví dụ, chất ức chế CYP17), chất ức chế HDM2, chất ức chế aromataza, chất ức chế sự tương tác p53 và/hoặc p53/Mdm2, hoặc chất ức chế CSF-1R tyrosin kinaza.

Các dược phẩm thích hợp bao gồm, ví dụ, viên nén, viên nang, thuốc đạn, dung dịch - đặc biệt là dung dịch tiêm (dưới da, trong tĩnh mạch, trong bắp) và truyền - cồn ngọt, hỗn dịch hoặc bột phân tán được. Hàm lượng của (các) hợp chất có hiệu quả được lý cần phải nằm trong khoảng từ 0,1 đến 90% khối lượng, tốt hơn từ 0,5 đến 50% khối lượng của tổng thành phần chế phẩm, tức là với các lượng đủ để đạt được phạm vi liều lượng được xác định dưới đây. Nếu cần, liều lượng đã định có thể được dùng vài lần trong một ngày.

Liều lượng của các thành phần tổ hợp nêu trên thông thường bằng 1/5 liều thấp nhất thường được khuyến cáo đến 1/1 liều thường được khuyến cáo.

Theo khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng có liên quan hoặc điều hoà được bằng, hoặc có thể bị ảnh hưởng bởi việc điều hoà STING ở đối tượng mắc bệnh, phương pháp này bao gồm bước dùng cho đối tượng mắc bệnh, tốt hơn là người, cần được điều trị, một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất theo sáng chế kết hợp với một lượng có tác dụng điều trị của một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung được mô tả trên đây.

Việc sử dụng hợp chất theo sáng chế kết hợp với chất trị liệu bổ sung có thể diễn ra đồng thời hoặc tại các thời điểm xen kẽ.

Hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung cả hai đều có thể có mặt cùng nhau trong một chế phẩm phối chế, hoặc riêng biệt trong hai chế phẩm phối chế giống nhau hoặc khác nhau, ví dụ, ở dạng được gọi là bộ kit nhiều phần.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung mô tả ở trên và sau đây, tùy ý cùng với một hoặc nhiều chất mang và/hoặc chất pha loãng trợ.

Các dấu hiệu và lợi ích khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ các ví dụ chi tiết hơn nữa dưới đây, các ví dụ này minh họa, theo các ví dụ, các nguyên lý của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tổng hợp hợp chất theo sáng chế

Lưu ý kỹ thuật chung

Thuật ngữ “nhiệt độ môi trường” và “nhiệt độ trong phòng” được sử dụng lẫn nhau và để chỉ nhiệt độ khoảng 20°C, ví dụ, 15 đến 25°C.

Theo quy định, phổ ^1H -NMR và phổ khối được thu thập với hợp chất điều chế được. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thao tác sắc ký được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng. Trong quá trình tổng hợp dinucleotit dạng vòng, việc làm bay hơi dung môi thường được tiến hành bằng cách làm bay hơi kiểu quay dưới áp suất giảm với nhiệt độ bể nước không vượt quá 35°C. Ngoài ra, trong quá trình tổng hợp dinucleotit dạng vòng, phản ứng được tiến hành trong môi trường nitơ hoặc argon.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Với phổ ^1H , độ chuyển dịch hóa học được tham chiếu đến tín hiệu dung môi DMSO (2,50 ppm) hoặc, với kết quả đo trong D_2O , đến DSS (axit 4,4-dimetyl-4-silapentan-1-sulfonic). Phổ ^{31}P NMR được tham khảo gián tiếp bằng cách so sánh tần số tuyệt đối của $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ (Bruker BioSpin GmbH, phần mềm: TopSpin, chương trình au: xsi). Toàn bộ các phổ ^{31}P NMR được ghi với việc khử ghép proton.

Danh sách các chữ viết tắt

ACN	axetonitril
aq.	trong nước

°C	độ Celsius
DA	mảng diot
DBU	diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
CEP	(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramit
DCM	diclometan
DDTT	3-((N,N-dimethyl-aminomethylidene)amino)-3H-1,2,4-dithiazol-3-thion
DIPEA	diisopropyletylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-dimethylformamid
DMOCP	2-clo-5,5-dimethyl-2-oxo-1,3,2-dioxaphosphorinan
DMT	4,4'-dimethoxytrityl
ESI-MS	Phổ khối ion hóa phun điện
EtOAc	ethyl axetat
eq	đương lượng
FC	sắc ký nhanh, SiO ₂ được sử dụng nếu không có chi tiết khác được đưa ra
h	giờ
HCl	clohydric
HATU	[dimethylamino-(1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)-metylen]-dimethyl-amoni hexaflorophosphat
HPLC	sắc ký lỏng hiệu năng cao
L	Lít
LiHMDS	lithi hexametyldisilazit
m/z	tỷ lệ khối lượng trên điện tích
MeOH	metanol
min	phút
mL	mililit
MS	phổ khối
n.d.	không được xác định
NH ₄ OH	dung dịch NH ₃ trong nước

Pd-PEPPSI-IPent™	diclo[1,3-bis(2,6-Di-3-pentylphenyl)imidazol-2-yliden](3-clopyridyl)palladium(II)
psi	pao trên inso vuông
RT	Nhiệt độ trong phòng (khoảng 20°C)
SEM	2-(trimetylsilyl)etoxymetyl
Sol	dung môi
TBS	<i>tert</i> -butyl-dimetylsilyl
TEA	trietyl amin
TEAF	trietylamoni format
TF / TFA	axit trifloaxetic
TFAA	anhydrit của axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
t _R	thời gian duy trì tính bằng phút

Cấu hình HPLC phân tích:

Cấu hình A (gradient HPLC):

VWR Hitachi: bơm L-2130; VWR Hitachi: thiết bị lấy mẫu tự động L-2200; VWR Hitachi: lò cột L-2350 (đặt ở 30°C); VWR Hitachi: thiết bị dò UV/Vis bước sóng thay đổi được L-2400; phần mềm EZChrom phiên bản 3,3,1 SP1.

YMC*GEL ODS-A 12 nm (10 µm; 250 x 0,4 mm)) kênh A= 20 mM TEAF (pH=6,8) trong nước; kênh B= 100 % axetonitril, 20 mM TEAF (pH=6,8). Gradient: 0 phút 100 % A; 30 phút 100 % B; 40 phút 100 % B, 30°C; lưu lượng: 1,0 mL/phút; UV 261 nm;

Cấu hình B (HPLC đẳng dòng):

VWR Hitachi: bơm L-7100; VWR Hitachi: thiết bị dò UV/Vis bước sóng thay đổi được L-7400; VWR Hitachi: bộ tích hợp D-7500.

Phân tích HPLC (cấu hình C; YMC*GEL ODS-A 12 nm (10 µm; 250 x 0,4 mm)) 11 % axetonitril, 20 mM TEAF (pH=6,8) trong nước; lưu lượng: 1,0 mL/phút; UV 264 nm;

Phân tích LC-MS:

Hệ HPLC: VWR Hitachi: bơm L-2130; VWR Hitachi: thiết bị lấy mẫu tự động L-2200;
VWR Hitachi: lò cột L-2300; VWR Hitachi: thiết bị dò mảng diot L-2450; Agilent:
OpenLab

Hệ MS: quang phổ kế Bruker Esquire LC 6000

Hệ A

Cột: Kromasil 100-5 C₈, 5 µm, 50 mm x 3 mm.

Lưu lượng: 0,4 mL/phút, 35°C, khoảng dò UV: 220-300 nm

Phổ khối: Ghi được trên thiết bị quang phổ khối sử dụng việc ion hóa phụ điện dương và âm tính

Dung môi: A: axetonitril

B: nước

C: 20 mM NH₄HCO₃ (pH=7) trong nước

Gradient:	Thời gian	A%	B%	C%
	0	20	75	5
	20	95	0	5
	23	95	0	5
	24	20	75	5
	30	20	75	5

Chuẩn bị mẫu: Mẫu (2 µL 10 µL) được hòa tan trong 175 µL axetonitril và 175 µL nước, thể tích bơm 2 µL 10 µL.

Hệ B

Cột: ACE 3 AQ 110-3 C₁₈, 5 µm, 50 mm x 3 mm.

Lưu lượng: 0,4 mL/phút, 35°C, khoảng dò UV: 220 300 nm

Phổ khối: Ghi được trên thiết bị quang phổ khối sử dụng việc ion hóa phụ điện dương và âm tính

Dung môi: A: axetonitril

B: nước

C: 20 mM NH₄HCO₃ (pH=7) trong nước

Gradient:	Thời gian	A%	B%	C%
	0	2	93	5
	20	60	35	5
	23	95	0	5
	24	2	93	5
	30	2	93	5

Nhà cung cấp thiết bị:		Agilent		
Mô tả:		Agilent 1200 với bộ dò DA và MS		
Tên phương pháp:		Hệ C		
Cột:		Sunfire, 3 x 30 mm, 2,5 µm		
Nhà cung cấp cột:		Waters		
Gradient/Dung môi	% Dung môi [H ₂ O, 0,1%TFA]	% Dung môi [Axetonitril]	Lưu lượng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
Thời gian [phút]				
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Nhà cung cấp thiết bị:		Agilent		
Mô tả:		Agilent 1200 với bộ dò DA và MS		
Tên phương pháp:		Hệ D		
Cột:		XBridge C18, 3 x 30 mm, 2,5 µm		
Nhà cung cấp cột:		Waters		
Gradient/Dung môi	% Dung môi [H ₂ O,0,1%NH ₃]	% Dung môi [Axetonitril]	Lưu lượng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
Thời gian [phút]				
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Nhà cung cấp thiết bị:		Agilent		
Mô tả:		Agilent 1200 với bộ dò DA và MS		

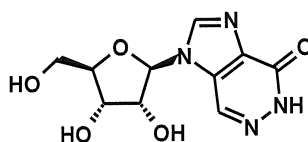
Tên phương pháp:		Hệ E		
Cột:		Stable Bond, 3 x 30 mm, 1,8 µm		
Nhà cung cấp cột:		Agilent		
Gradient/Dung môi	% Dung môi [H ₂ O,0,1%TFA]	% Dung môi [Axetonitril]	Lưu lượng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
Thời gian [phút]				
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Nhà cung cấp thiết bị:		Agilent		
Mô tả:		Agilent 1200 với bộ dò DA và MS		
Tên phương pháp:		Hệ F		
Cột:		Nucleodur SiOH, 3 x 30 mm, 5,0 μ m		
Nhà cung cấp cột:		Macherey-Nagel		
Gradient/Dung môi	% Dung môi DCM	% Dung môi MeOH	Lưu lượng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
Thời gian [phút]				
0,00	100	0	2,5	30
0,60	100	0	2,5	30
1,80	95	5	2,5	30
2,60	75	25	2,5	30
3,00	50	50	2,5	30
3,10	0	100	2,5	30
3,50	0	100	2,5	30
3,55	100	0	2,5	30
3,80	100	0	2,5	30
5,00	100	0	3,0	30
5,20	100	0	3,0	30

Quy trình tổng hợp các hợp chất trung gian

Hợp chất trung gian 1.1

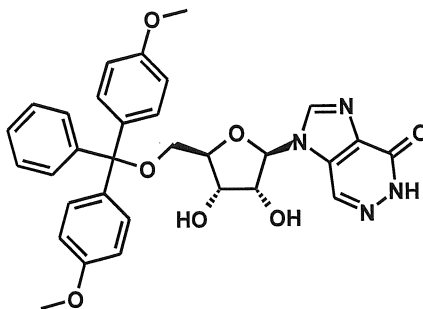
Imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (1-(β -D-ribofuranosyl)imidazo[4,5-d]pyridazin-4(5H)-on)



Hợp chất nêu ở đề mục này được điều chế như được mô tả trong *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1989, 1769-1774.

Hợp chất trung gian 1.2

5'-DMT-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit



Imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.1, 4,00 g, 14,9 mmol) được tạo hỗn hợp đồng sôi với pyridin khan (3 x 20 mL), làm khô *trong chân không* và hòa tan trong pyridin khan (25 mL). Bổ sung dung dịch chứa 4,4'-dimetoxylrityl clorua (5,05 g, 14,9 mmol) trong pyridin khan (15 mL) vào dung dịch này và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 1 h ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi dưới áp suất giảm và cặn thu được được tinh chế bằng HPLC pha đảo điều chế (X-Bridge C18, axetonitril/ nước NH₃)

LC-MS (hệ D):

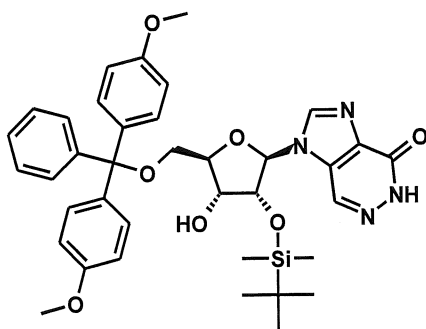
$t_{\text{Ret}} = 0,82$ phút;

ESI-MS: 571 [M+H]⁺

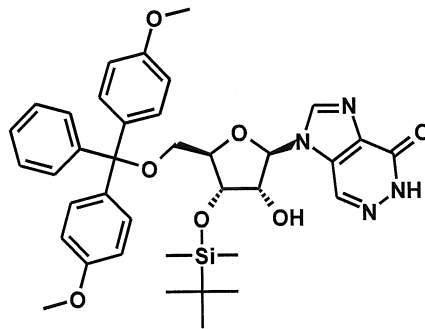
Hợp chất trung gian 1.3-a và Hợp chất trung gian 1.3-b

5'-DMT-2'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.3-a) và

5'-DMT-3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.3-b)



Hợp chất trung gian 1.3-a



Hợp chất trung gian 1.3-b

5'-DMT-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.2, 5,30 g, 9,29 mmol) được tạo hỗn hợp đồng sôi với pyridin khan (3 x 30 mL), làm khô *trong chân không* và hòa tan trong pyridin khan (20 mL). Bổ sung imidazol (1,90 g, 27,9 mmol) và *tert*-butylclodimetylsilan (1,54 g, 10,2 mmol) vào dung dịch này và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 6 h ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được cho phân bố giữa diclometan và nước. Lớp hữu cơ được tách và lớp nước được chiết bằng diclometan. Gom dịch chiết hữu cơ, rửa bằng nước muối, làm khô sử dụng phối liệu thủy tinh kỵ nước và làm bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột áp suất trung bình (silicagel, gradient 5-20% axeton trong diclometan).

LC-MS (hệ F):

Hợp chất trung gian 1.3-a : $t_{Ret} = 1,57$ phút;

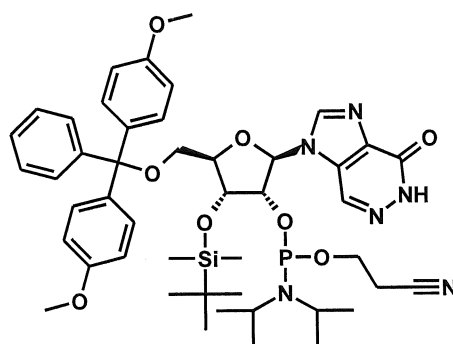
ESI-MS: 685 $[M+H]^+$

Hợp chất trung gian 1.3-b: $t_{Ret} = 1,67$ phút;

ESI-MS: 685 $[M+H]^+$

Hợp chất trung gian 1.4

5'-DMT-3'-TBS-2'-CEP-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit



5'-DMT-3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.3-b, 1,75 g, 2,56 mmol) được tạo hỗn hợp đồng sôi với axetonitril khan (3 x 25 mL), làm khô *trong chân không* và hòa tan trong diclometan khan (45 mL). Bổ sung 2-cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit (1,62 mL, 5,12 mmol) và tetrazol (5,69 mL dung dịch 0,5 M trong axetonitril, 2,85 mmol) vào dung dịch này và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 h. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng với diclometan và rửa bằng dung dịch nước natri hydro cacbonat. Lớp hữu cơ được tách và lớp nước được chiết bằng diclometan. Gom dịch chiết hữu cơ, làm khô sử dụng phối liệu thủy tinh kỵ nước và làm bay hơi dưới áp suất giảm. Cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột áp suất trung bình (silicagel (khử hoạt hóa bằng trietylamin

trong diclometan), gradient 20-100% etyl axetat (3% trietylamin) trong xyclohexan). Sản phẩm thu được dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang.

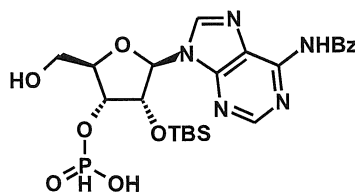
LC-MS (hệ D):

$t_{\text{Ret}} = 1,33$ phút; ESI-MS: 885 $[M+H]^+$

^{31}P NMR (162 MHz, 303 K, CDCl_3) δ 150,9 và 149,7 ppm.

Hợp chất trung gian 1.5

5'-OH-2'-TBS-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-adenosin



N⁶-Bz-5'-DMT-2'-TBS-3'-CEP-adenosin (thu được từ ChemGenes, 0,890 g, 0,90 mmol) được hòa tan trong axetonitril (15 mL) và nước (0,033 mL, 1,83 mmol, 2 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung pyridini trifloaxetat (0,210 g, 1,09 mmol, 1,2 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Bổ sung *tert*-Butylamin (10 mL, 95,7 mmol) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi dưới áp suất giảm, hòa tan lại trong axetonitril khan (25 mL) và làm bay hơi dưới áp suất giảm để tạo ra bột màu trắng đến không màu. Cặn được hòa tan trong diclometan (25 mL) và nước (0,162 mL, 9 mmol, 10 đương lượng). Bổ sung axit dicloaxetic (0,670 mL, 8,12 mmol, 9 đương lượng) trong diclometan (25 mL) và dung dịch màu da cam thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Bổ sung pyridin (1,31 mL, 16,23 mmol, 18 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút.

Phân tích LC-MS nguyên liệu thô xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 1.5.

LC-MS (hệ A):

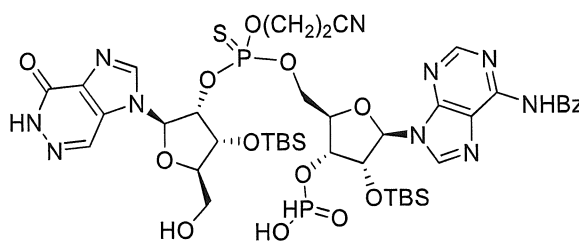
$t_{\text{Ret}} = 3,10$ phút; ESI-MS: 550 $[M+H]^+$

Bình phản ứng được đậy nắp, bịt kín cẩn thận và bảo quản ở + 2°C trong 16 giờ. Dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm và cặn được tạo hỗn hợp đồng sôi với axetonitril

khan (4 x 15 mL). Trong quá trình làm bay hơi cuối cùng, dung dịch được cô đến khoảng 5 mL cuối cùng hỗn hợp đồng sôi. Dung dịch chứa Hợp chất trung gian 1.5 khan thu được được sử dụng ngay lập tức trong các bước tiếp theo của phản ứng.

Hợp chất trung gian 1.6

5'-OH-3'-TBS-imidazopyridazinon-β-D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoethyl-phosphorothioat-2'-TBS-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-adenosin dime thẳng



5'-DMT-3'-TBS-2'-CEP-imidazopyridazinon-β-D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.4, 1,340 g, 1,51 mmol, 1,7 đương lượng) được tạo hỗn hợp đồng sôi với axetonitril khan (4x10 mL). Trong quá trình làm bay hơi cuối cùng dung dịch được cô đến khoảng 3 mL hỗn hợp đồng sôi cuối cùng. Bổ sung dung dịch thu được vào 5'-OH-2'-TBS-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-adenosin (Hợp chất trung gian 1.5) hòa tan trong khoảng 5 mL axetonitril khan (lượng lý thuyết của chất mong muốn: 0,495 g, 0,90 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Bổ sung ((*N,N*-dimethylamino-metyliden)amino)-3*H*-1,2,4-dithiazolin-3-thion (DDTT) (0,203 g, 0,99 mmol, 1,1 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các chất dễ bay hơi được làm bay hơi dưới áp suất giảm và cặn được hòa tan trong diclometan (25 mL) và nước (0,162 mL, 9 mmol, 10 đương lượng). Bổ sung axit dicloaxetic (1,340 mL, 16,24 mmol, 18 đương lượng) trong diclometan (25 mL), và dung dịch màu da cam được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Bổ sung pyridin (10 mL) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút.

Phân tích LC-MS nguyên liệu thô xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 1.6 dưới dạng hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang.

LC-MS (hệ A):

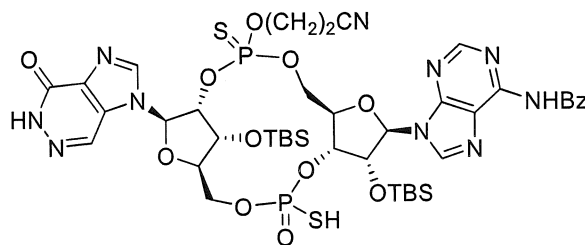
Hợp chất trung gian 1.6-a: $t_{\text{Ret}} = 7,36$ phút; Hợp chất trung gian 1.6-b: $t_{\text{Ret}} = 7,57$ phút;

ESI-MS: 1063 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Bình phản ứng được đầy nắp, bịt kín cẩn thận và bảo quản ở $+2^\circ\text{C}$ trong 16 giờ. Hỗn hợp này được làm bay hơi dưới áp suất giảm và cặn được làm đồng bay hơi với pyridin khan (2 x 20 mL) dưới áp suất giảm. Bổ sung một phần 40 mL pyridin khan nữa và cặn được cô dưới áp suất giảm đến khoảng 20 mL tổng thể tích Dung dịch chứa Hợp chất trung gian 1.6 khan thu được được sử dụng ngay lập tức trong các bước tiếp theo của phản ứng.

Hợp chất trung gian 1.7

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoethyl-phosphorothioat-2'-TBS- N^6 -Bz-adenosin-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Bổ sung 2-clo-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphorinan 2-oxit (DMOCP) (0,581 g, 3,15 mmol, 3,5 đương lượng) vào 5'-OH-3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-CE-PS-2'-TBS-3'-H-phosphonat- N^6 -Bz-adenosin thô (Hợp chất trung gian 1.6) (lượng lý thuyết của chất mong muốn quá trình điều chế chất thô: 0,957 g, 0,90 mmol) trong pyridin khan với tổng thể tích khoảng 20 mL. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Bổ sung nước (0,570 mL, 31,6 mmol, 35,1 đương lượng) và 3H-1,2-benzodithiol-3-on (0,230 g, 1,37 mmol, 1,5 đương lượng) và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 20 phút, hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch chứa natri hydro cacbonat (4,500 g, 53,6 mmol) trong 150 mL nước và lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, tiếp theo là bổ sung hỗn hợp gồm etyl axetat metyl-*tert*-butylete (150 mL, 1:1). Pha hữu cơ được tách và pha nước được chiết thêm hai lần bằng etyl axetat metyl-*tert*-butylete (2 x 75 mL, 1:1). Gom các pha hữu cơ, làm khô bằng khan magie sulfat, tiếp theo là làm bay hơi dung môi dưới áp suất giảm và cuối cùng làm đồng bay hơi với 100 mL toluen khan. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký nhanh

điều chế (160 g silicagel, gradient 0–12,5% MeOH trong diclometan) để tạo ra 0,78 g Hợp chất trung gian 1.7 đã làm giàu tinh khiết (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang).

LC-MS (hệ A):

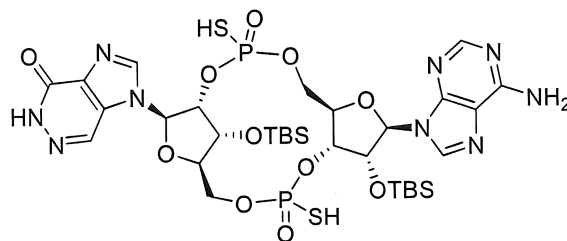
Hợp chất trung gian 1.7-a: $t_{\text{Ret}} = 7,56$ phút; Hợp chất trung gian 1.7-b: $t_{\text{Ret}} = 8,18$ phút;

Hợp chất trung gian 1.7-c: $t_{\text{Ret}} = 9,02$ phút; Hợp chất trung gian 1.7-d: $t_{\text{Ret}} = 10,17$ phút;

ESI-MS: 1077 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 1.8

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-phosphorothioat-2'-TBS-adenosin-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Bổ sung 125 mL metylamin 33 % trong etanol tuyệt đối vào 3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoetyl-phosphorothioat-2'-TBS-N⁶-Bz-adenosin-(3'→5')-phosphorothioat đã làm giàu tinh khiết (Hợp chất trung gian 1.7; 0,780 g) và dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Toàn bộ các chất dễ bay hơi được làm bay hơi dưới áp suất giảm và làm khô tiếp *trong chân không* để tạo ra 0,758 g Hợp chất trung gian 1.8 thô (hỗn hợp chất đồng phân không đối quang), mà nó được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

LC-MS (hệ A):

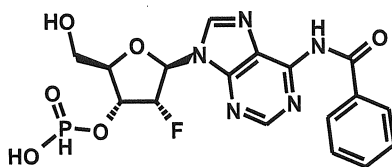
Hợp chất trung gian 1.8-a: $t_{\text{Ret}} = 1,47$ phút; Hợp chất trung gian 1.8-b: $t_{\text{Ret}} = 3,60$ phút;

Hợp chất trung gian 1.8-c: $t_{\text{Ret}} = 3,90$ phút; Hợp chất trung gian 1.8-d: $t_{\text{Ret}} = 5,53$ phút;

ESI-MS: 920 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 2.1

5'-OH-2'-F-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-2'-deoxyadenosin



N⁶-Benzoyl-5'-DMT-2'-F-2'-deoxyadenosin-3'-CEP (thu được từ Alfa Aesar) (1,05 g, 1,20 mmol) được hòa tan trong axetonitril (6 mL) và nước (0,043 mL, 2,40 mmol, 2 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung pyridini trifloaxetat (278 mg, 1,44 mmol, 1,2 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, bổ sung *tert*-butylamin (6,0 mL, 57,1 mmol) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi *trong chân không*, hòa tan lại (2x) trong axetonitril khan (12 mL) và làm bay hơi lại *trong chân không* để tạo ra bột màu trắng đến không màu. Cặn được hòa tan trong diclometan (14,4 mL) và nước (0,22 mL, 12,0 mmol, 10 đương lượng). Bổ sung axit dicloaxetic trong diclometan (6%, 14,4 mL) và dung dịch màu da cam thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Bổ sung pyridin (1,64 mL, 20,3 mmol, 17 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi *trong chân không* và tạo hỗn hợp đồng sôi với axetonitril khan (3 x 11 mL). Cuối cùng, sản phẩm thô còn lại được làm khô trong chân không cao trong 30 phút nữa và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Phân tích LC-MS nguyên liệu thô xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 2.1.

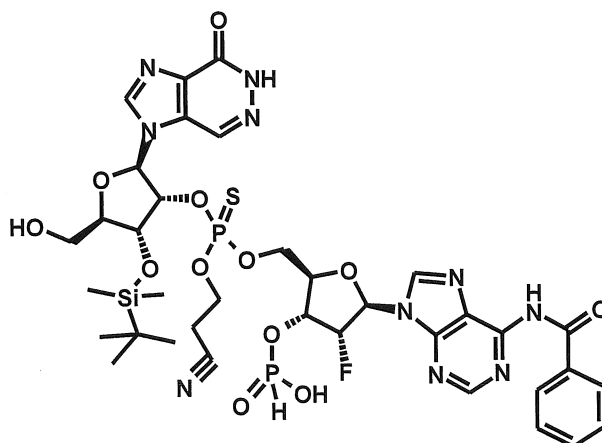
LC-MS (hệ E):

$t_{\text{Ret}} = 0,64$ phút

ESI-MS: 438 [M+H]⁺.

Hợp chất trung gian 2.2

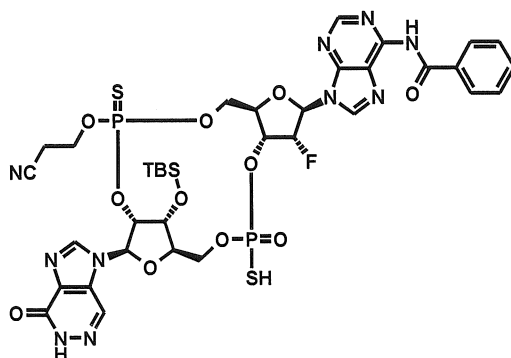
5'-OH-3'-TBS-imidazopyridazinon-β-D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoethyl-phosphorothioat-2'-F-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-2'-deoxyadenosin dime thẳng



5'-DMT-3'-TBS-2'-CEP-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit (Hợp chất trung gian 1.4, 1,38 g, 1,56 mmol, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong axetonitril khan (10 mL) và được làm bay hơi đồng sôi *trong chân không*. Thao tác này được lặp lại ba lần nữa tạo ra khoảng 5 mL hỗn hợp đồng sôi trong bình phản ứng vào lần làm bay hơi cuối cùng. Bổ sung 10 miếng rây phân tử (3Å) và bổ sung hỗn hợp thu được vào 5'-OH-2'-F-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-2'-deoxyadenosin (Hợp chất trung gian 2.1) đã hòa tan trong khoảng 3 mL axetonitril khan (lượng lý thuyết của chất mong muốn: 523 mg, 1,20 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Bổ sung ((N,N-dimethylamino-metyliden)amino)-3H-1,2,4-dithiazolin-3-thion (DDTT) (275 mg, 1,34 mmol, 0,9 đương lượng) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các chất dễ bay hơi được làm bay hơi *trong chân không* và cặn được hòa tan trong diclometan (20 mL) và nước (0,216 mL, 12 mmol, 7,7 đương lượng). Bổ sung axit dicloaxetic trong diclometan (6%, 19,2 mL) và dung dịch màu da cam thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Sau giai đoạn này, bổ sung pyridin (12 mL) và hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi *trong chân không*. Cuối cùng, sản phẩm thô còn lại được làm khô trong chân không cao trong 30 phút nữa và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm và xác định đặc điểm.

Hợp chất trung gian 2.3

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoetyl-phosphorothioat-2'-F-N⁶-Bz-2'-deoxyadenosin-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Hợp chất trung gian 2.2 thô (lượng lý thuyết tối đa của chất mong muốn: 1,48 g, 1,56 mmol) được hòa tan trong 36 mL pyridin khan và khử đến khoảng 20 mL *trong chân không*. Bổ sung 2-clo-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphorinan 2-oxit (DMOCP) (775 mg, 4,20 mmol, 2,7 đương lượng) và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Bổ sung nước (0,75 mL, 41,3 mmol, 26,5 đương lượng) và 3H-1,2-benzodithiol-3-on (0,302 g, 1,80 mmol, 1,15 đương lượng) và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 5 phút, hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch chứa natri hydro cacbonat (4,00 g, 47,6 mmol) trong 140 mL nước và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, tiếp theo là bổ sung hỗn hợp gồm etyl axetat metyl-*tert*-butylete (140 mL, 1:1). Pha hữu cơ được tách và pha nước được chiết tiếp bằng etyl axetat metyl-*tert*-butylete (1:1). Gom các pha hữu cơ và dung môi được loại bỏ *trong chân không*.

Cặn còn lại được hòa tan trong thể tích tối thiểu diclometan và tinh chế bằng sắc ký nhanh điều chế (silicagel, DCM/MeOH: 100/0 $\rightarrow$ 80/20). Các phân đoạn được phân tích bằng HPLC-MS. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và dung môi loại bỏ *trong chân không* để tạo ra 900 mg hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang.

Phân tích LC-MS các chất xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 2.3-a/b/c/d.

LC-MS (hê E):

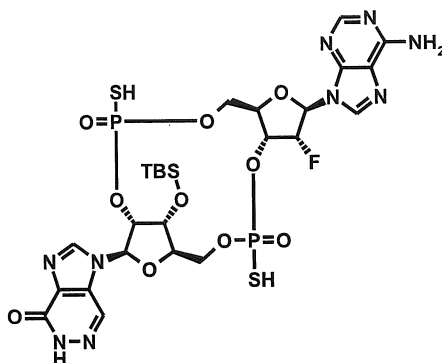
Hợp chất trung gian 2.3-a: $t_{Ret} = 0,95$ phút; Hợp chất trung gian 2.3-b: $t_{Ret} = 0,98$ phút;

Hợp chất trung gian 2.3-c: $t_{Ret} = 1,00$ phút; Hợp chất trung gian 2.3-d: $t_{Ret} = 1,03$ phút;

ESI-MS: 965 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 2.4

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-phosphorothioat-2'-F-2'-
deoxyadenosin-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Bổ sung 300 mg (lượng lý thuyết tối đa của chất mong muốn: 0,31 mmol) Hợp chất trung gian 2.3 vào 10 mL metanol và 10 mL dung dịch nước amoniac (30-33%). Hỗn hợp thu được được khuấy ở 50 °C trong 15 h. Hỗn hợp phản ứng này được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng và nitor được sự qua hỗn hợp này trong 30 phút. Dung môi được loại bỏ *trong chân không*, hòa tan lại hỗn hợp này trong axetonitril khan (30 mL) và làm bay hơi lại *trong chân không*. Cặn được nghiền với axetonitril khan, lọc, rửa bằng 5ml ACN và làm khô qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm thô được hòa tan trong DMF và tinh chế bằng HPLC điều chế (X-Bridge C-18; axetonitril/H₂O/NH₃). Các phân đoạn chứa sản phẩm được gom và dung môi được loại bỏ bằng cách làm đông khô nhanh. Theo phương pháp này, có thể tách các chất đồng phân không đối quang.

Phân tích LC-MS các chất xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 2,4-a/b/c/d.

LC-MS (hệ C):

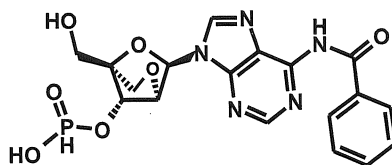
Hợp chất trung gian 2.4-a: $t_{\text{Ret}} = 1,04$ phút; Hợp chất trung gian 2.4-b: $t_{\text{Ret}} = 1,10$ phút;

Hợp chất trung gian 2.4-c: $t_{\text{Ret}} = 1,13$ phút; Hợp chất trung gian 2.4-d: $t_{\text{Ret}} = 1,15$ phút;

ESI-MS: 808 [M+H]⁺ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 3.1

5'-OH-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-LNA-adenin



Hợp chất trung gian 3.1 được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 2.1 bằng cách sử dụng “LNA-A amidit” (EQ-0063-1000, thu được từ Exiqon) làm nguyên liệu ban đầu.

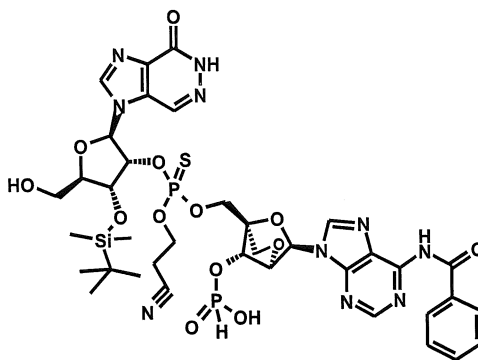
Phân tích LC-MS nguyên liệu thô xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 3.1.

LC-MS (hệ E):

$t_{\text{Ret}} = 0,63$ phút; ESI-MS: 448 $[M+H]^+$

Hợp chất trung gian 3.2

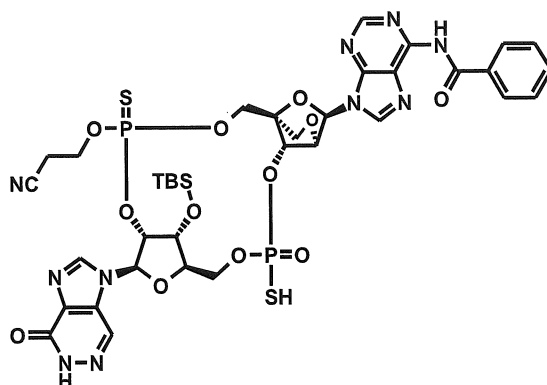
5'-OH-3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoetyl-phosphorothioat-3'-H-phosphonat-N⁶-Bz-LNA-adenin dime thẳng



Hợp chất trung gian 3.2 được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 2.2 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 3.1 và Hợp chất trung gian 1.4 làm nguyên liệu ban đầu.

Hợp chất trung gian 3.3

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoetyl-phosphoro-thioat-N⁶-Bz-LNA-adenin-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Hợp chất trung gian 3.3 được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 2.3 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 3.2 làm nguyên liệu ban đầu.

Phân tích LC-MS các chất xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 3.3-a/b/c/d.

LC-MS (hệ E):

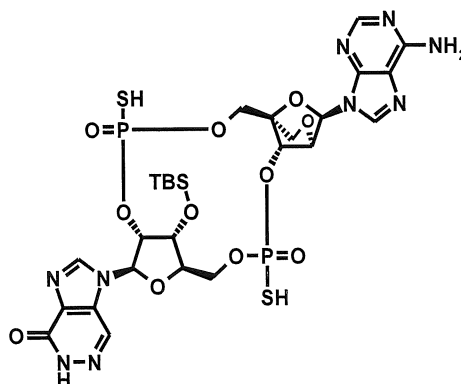
Hợp chất trung gian 3.3-a: $t_{Ret} = 0,94$ phút; Hợp chất trung gian 3.3-b: $t_{Ret} = 0,98$ phút;

Hợp chất trung gian 3.3-c: $t_{Ret} = 0,99$ phút; Hợp chất trung gian 3.3-d: $t_{Ret} = 1,03$ phút;

ESI-MS: 975 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 3.4

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2' $\rightarrow$ 5')-phosphorothioat-LNA-adenin-(3' $\rightarrow$ 5')-phosphorothioat dime vòng



Hợp chất trung gian 3.4 được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 2.4 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 3.3 làm nguyên liệu ban đầu.

Phân tích LC-MS các chất xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 3.4-a/b/c/d.

LC-MS (hệ C):

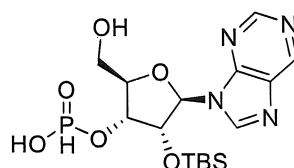
Hợp chất trung gian 3.4-a: $t_{\text{Ret}} = 0,81$ phút; Hợp chất trung gian 3.4-b: $t_{\text{Ret}} = 0,89$ phút;

Hợp chất trung gian 3.4-c: $t_{\text{Ret}} = 0,91$ phút; Hợp chất trung gian 3.4-d: $t_{\text{Ret}} = 0,99$ phút;

ESI-MS: 818 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 4.1

5'-OH-2'-TBS-3'-H-phosphonat-purin- β -D-ribofuranosit



Hợp chất trung gian 4.1 được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 1.5 bằng cách sử dụng 5'-DMT-2'-TBS-3'-CEP-purin- β -D-ribofuranosit làm nguyên liệu ban đầu mà nó có thể được điều chế như được mô tả trong Fu *et al.* Biochemistry 1993, 32, 10629 10637. Trái với Hợp chất trung gian 1.5, hợp chất trung gian này không được bảo quản qua đêm nhưng được sử dụng ngay lập tức trong các bước tiếp theo của phản ứng.

Phân tích LC-MS nguyên liệu thô xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 4.1.

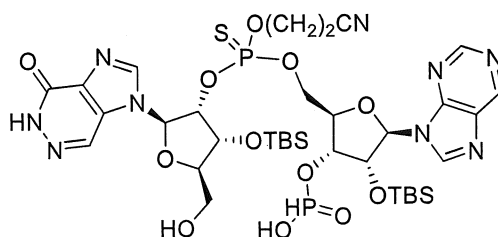
LC-MS (hệ B):

$t_{\text{Ret}} = 8,56$ phút;

ESI-MS: 431 $[M+H]^+$

Hợp chất trung gian 4.2

5'-OH-3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoethyl-phosphorothioat-2'-TBS-3'-H-phosphonat-purin- β -D-ribofuranosit dime thẳng



Hợp chất trung gian 4.2 được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 1.6 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 1.4 và Hợp chất trung gian 4.1 được mô tả trên đây làm nguyên liệu ban đầu.

Phân tích LC-MS nguyên liệu thô xác nhận sự có mặt của Hợp chất trung gian 4.2 dưới dạng hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang.

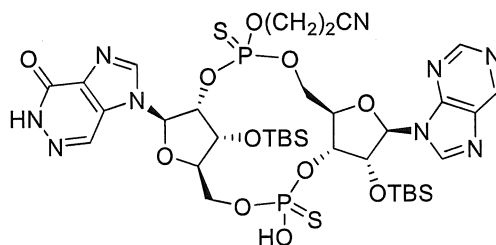
LC-MS (hệ B):

Hợp chất trung gian 4.2-a: $t_{Ret} = 14,86$ phút; Hợp chất trung gian 4.2-b: $t_{Ret} = 15,01$ phút;

ESI-MS: 944 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 4.3

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-xyanoethyl-phosphoro-thioat-2'-TBS-purin- β -D-ribofuranosit-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Hợp chất trung gian 4.3 (dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang) được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 1.7 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 4.2 làm nguyên liệu ban đầu.

LC-MS (hệ B):

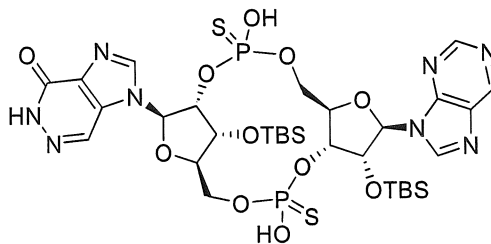
Hợp chất trung gian 4.3-a: $t_{Ret} = 15,76$ phút; Hợp chất trung gian 4.3-b: $t_{Ret} = 16,61$ phút;

Hợp chất trung gian 4.3-c: $t_{Ret} = 17,68$ phút; Hợp chất trung gian 4.3-d: $t_{Ret} = 19,26$ phút;

ESI-MS: 958 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

Hợp chất trung gian 4.4

3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-phosphorothioat-2'-TBS-purin- β -D-ribofuranosit-(3'→5')-phosphorothioat dime vòng



Hợp chất trung gian 4.4 (dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang) được điều chế theo cách tương tự với Hợp chất trung gian 1.8 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 4.3 làm nguyên liệu ban đầu.

LC-MS (hệ B):

Hợp chất trung gian 4.4-a: $t_{\text{Ret}} = 10,31$ phút; Hợp chất trung gian 4.4-b: $t_{\text{Ret}} = 11,82$ phút;

Hợp chất trung gian 4.4-c: $t_{\text{Ret}} = 12,26$ phút; Hợp chất trung gian 4.4-d: $t_{\text{Ret}} = 14,47$ phút;

ESI-MS: 905 $[M+H]^+$ đối với mỗi chất đồng phân không đối quang.

QUY TRÌNH TỔNG HỢP CÁC HỢP CHẤT THEO SÁNG CHẾ

Lưu ý chung: Các cặp hợp chất sau lần lượt là các chất đồng phân không đối quang và khác nhau về cấu hình của ít nhất một nguyên tử phospho:

Ví dụ 1.1 và Ví dụ 1.2;

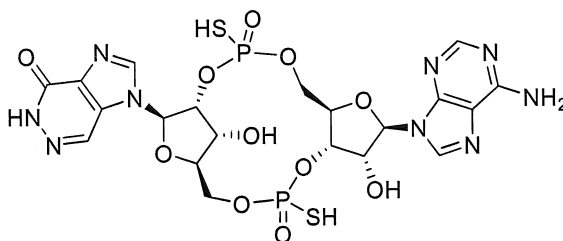
Ví dụ 2.1 và Ví dụ 2.2;

Ví dụ 3.1 và Ví dụ 3.2;

Ví dụ 4.1 và Ví dụ 4.2.

Ví dụ 1.1 và Ví dụ 1.2

(Imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2' $\rightarrow$ 5')-phosphorothioat-adenosin-(3' $\rightarrow$ 5')-phosphorothioat) vòng



Bổ sung 30 mL pyridin khan và 15 mL khan triethylamin vào 3'-TBS-imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-phosphorothioat-2'-TBS-adenosin-(3'→5')-phosphorothioat thô (Hợp chất trung gian 1.8; 0,76 g). Dung dịch thu được được cô dưới áp suất giảm đến khoảng 5 mL tổng thể tích tiếp theo là bổ sung đồng thời triethylamin trihydroflorua (3,590 mL, 21,7 mmol) và 11 mL triethylamin khan. Dung dịch này được khuấy ở 50°C trong 3,5 giờ. Sau khi làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng metoxytrimethylsilan (10 mL, 72,4 mmol) và khuấy tiếp ở nhiệt độ trong phòng để tiêu thụ hết lượng HF còn dư. Sau 30 phút, toàn bộ các chất dễ bay hơi được làm bay hơi dưới áp suất giảm, tiếp theo là cuối cùng làm đồng bay hơi với 50 mL toluen khan dưới áp suất giảm. Cặn được làm khô tiếp *trong chân không* để tạo ra hỗn hợp thô chứa Ví dụ 1.1 và Ví dụ 1.2.

Bổ sung 65 mL nước và huyền phù thu được được cho vào bể siêu âm ở nhiệt độ trong phòng. Sau 15 phút, huyền phù này được rót vào 60 mL cloroform và pha hữu cơ được tách. Việc chiết này được lặp lại hai lần nữa với cloroform. Gôm các pha hữu cơ, chiết bằng 50 mL nước và gom pha nước chứa sản phẩm, lọc bằng phễu lọc xiranh 0,45 μ m Rotilabo®-CME (đường kính ngoài: 33 mm) để loại bỏ các thành phần hạt. Dung dịch sản phẩm được pha loãng với nước đến 500 mL và cho vào cột trao đổi ion Q Sepharose™ Fast Lưu lượng (40 165 μ m; 125 x 35 mm; ~120 mL) Cl⁻-form, đã được tái sinh trước bằng dung dịch natri clorua 2 M và rửa bằng nước. Cột được rửa bằng nước (2 thể tích cột), tiếp theo là gradient dung dịch đệm triethylamoni bicacbonat 0 1 M (TEAB, pH=7) trong nước trong 25 thể tích cột (bước đóng dò 254 nm). Ví dụ 1.1 và Ví dụ 1.2 được rửa giải dưới dạng hỗn hợp các chất đồng phân bằng TEAB ~ 0,6 M. Các phân đoạn chứa sản phẩm được cô cẩn thận đến thể tích cuối cùng khoảng 10 mL dưới áp suất giảm.

Tách Ví dụ 1.1 (rửa giải lần thứ tư) và Ví dụ 1.2 (rửa giải lần thứ ba) được thực hiện bằng cách lặp lại việc tinh chế pha đảo điều chế bán HPLC. Dung dịch sản phẩm được cho vào cột YMC*GEL ODS-A 12 nm (10 μ m; 250 x 16 mm; ~50 mL), được cân bằng trước bằng axetonitril 4 %, 20 mM triethylamoni format (TEAF, pH 6,8) trong nước. Việc rửa giải được tiến hành bằng gradient theo bậc axetonitril 4 %, 6 % và 20 % 20 mM TEAF (pH=6,8) trong nước.

Điều chế Ví dụ 1.1, muối natri (“chất đồng phân không đối quang rửa giải lần thứ tư”)

Khử muối của Ví dụ 1.1, muối TEA được tiến hành bằng cách sắc ký lỏng áp suất trung bình pha đảo điều chế (MPLC). Dung dịch sản phẩm (~40 mL) được cho vào cột Merck LiChrorep®RP-18 (15 25 μ m; 450 x 25 mm; ~220 mL), được cân bằng trước bằng nước. Cột được rửa bằng nước để loại bỏ dung dịch đệm TEAF dư. Sau đó, 2-propanol 2 % trong nước được sử dụng để rửa giải Ví dụ 1.1 đã khử muối. Các phân đoạn chứa sản phẩm được cô một phần dưới áp suất giảm và tiếp theo, cho vào cột trao đổi cation dòng nhanh SP Sepharose™ (45 165 μ m; 125 x 35 mm; ~120 mL) dạng Na⁺, đã được tái sinh trước bằng dung dịch natri clorua 2 M và rửa bằng nước. Cột này được rửa bằng nước cho đến khi không phát hiện được sự hấp thụ bằng tia UV nữa (bước sóng dò 254 nm). Các phân đoạn chứa sản phẩm được làm bay hơi cẩn thận dưới áp suất giảm và làm khô bổ sung *trong chân không* để tạo ra Ví dụ 1.1 dưới dạng muối dinatri.

HPLC (cấu hình A): t_{Ret} = 8,56 phút;

ESI-MS: 692 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, 318 K, 500 μ L (CD₃)₂SO + 30 μ L D₂O) δ 8,70 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 6,07 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,91 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 5,07 4,99 (m, 2H), 4,95 (dd, J = 7,5, 4,5 Hz, 1H), 4,44 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,33 4,21 (m, 3H), 4,05 3,93 (m, 1H), 3,92 3,77 (m, 2H) ppm.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O): δ 52,4 (s, 1P), 55,3 (s, 1P) ppm.

Điều chế Ví dụ 1.2, muối natri (“rửa giải lần thứ ba chất đồng phân không đối quang”)

Việc khử muối và thay đổi muối từ TEA thành muối natri của Ví dụ 1.2, muối TEA được tiến hành như được mô tả cho Ví dụ 1.1, muối TEA.

HPLC (cấu hình A): t_{Ret} = 7,75 phút;

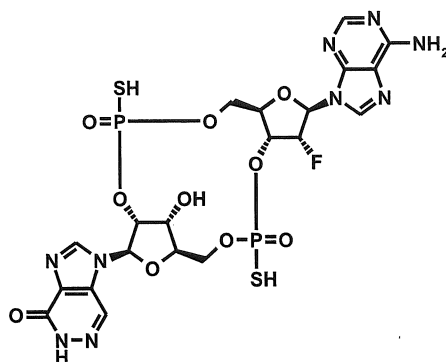
ESI-MS: 692 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, 318 K, 500 μ L (CD₃)₂SO + 30 μ L D₂O) δ 8,72 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,88 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,25 (dd, J = 8,5, 4,4 Hz, 1H), 5,08 (ddd, J = 11,2, 8,4, 4,5 Hz, 1H), 4,92 (dd, J = 8,2, 4,3 Hz, 1H), 4,37 4,27 (m, 1H), 4,27 4,21 (m, 3H), 4,08 (dd, J = 11,0, 4,2 Hz, 1H), 3,82 3,77 (m, 1H), 3,67 3,60 (m, 1H) ppm.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O): δ 55,8 (s, 1P), 57,0 (s, 1P) ppm.

Ví dụ 2.1 và Ví dụ 2.2

(Imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2'→5')-phosphorothioat-2'-F-2'-
deoxyadenosin-(3'→5')-phosphorothioat vòng



Bổ sung 16 mg (19 μ mol) Hợp chất trung gian 2.4-d vào 1 mL pyridin khan và 4 mL axetonitril khan và dung môi được làm bay hơi đồng sôi *trong chân không*. Cặn được tái tạo huyền phù hai lần trong 10 mL axetonitril khan và lại làm bay hơi đồng sôi *trong chân không*. Bổ sung 80,7 μ L (1,0 mmol) pyridin khan và 168 μ L (1,2 μ mol) TEA vào cặn trước khi 103 μ L (0,63 mmol) TEA*3HF được bổ sung cẩn thận qua xiranh. Hỗn hợp thu được được khuấy ở 50 °C trong 90 phút. Sau khi làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng cách bổ sung 20 mL dung dịch nước triethylamoni cacbonat (nồng độ = 1 mol/L). Hỗn hợp thu được được khuấy trong 15 phút nữa ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được nạp cẩn thận vào ống Water Sep Pak C18 © (5g vật liệu C18, đầu tiên được xử lý bằng 25 mL axetonitril và sau đó, bằng 25 mL nước) và rửa bằng 60 mL nước. Sau đó, sản phẩm được rửa giải ra khỏi ống này bằng cách sử dụng 100 mL hỗn hợp axetonitril/triethylamoni axetat/nước (được điều chế bằng cách bổ sung 1 mL dung dịch nước triethylamoni axetat (nồng độ = 1 mol/L) vào 100 mL nước và 25 mL axetonitril). Các phân đoạn chứa sản phẩm được gom và dung môi được loại bỏ bằng cách làm đông khô nhanh. Sản phẩm thu được được tinh chế thêm bằng HPLC điều chế (Atlantis C18; 20 mM dung dịch nước NH₄OAc axetonitril = 98/2 → 80/20.). Sau khi dung môi được loại bỏ bằng cách làm đông khô nhanh, sản phẩm được hòa tan trong 2 mL nước và rót vào cột Bio-Rad Spin (được nhồi 250 mg nhựa BT AG 50W-2 100-200 Mesh hydro Form, xử lý bằng 3 mL dung dịch nước NaOH 1M và sau đó, rửa bằng 6 mL

nước, tạo ra pH~7)) và rửa giải bằng 12 mL nước. Các phân đoạn chứa sản phẩm cuối cùng được gom và dung môi được loại bỏ bằng cách làm đông khô nhanh.

Ví dụ 2.1:

LC-MS (hệ C):

$t_{Ret} = 0,61$ phút; ESI-MS: 694 $[M+H]^+$

1H NMR (400 MHz, 303 K, D_2O) δ ppm 8,73 (s, 1 H), 8,53 (s, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 7,96 (s, 1 H), 6,40 (d, $J=15,9$ Hz, 1 H), 6,26 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 5,55 (dd, $J=51,1, 3,8$ Hz, 1 H), 4,83 4,99 (m, 2 H), 4,75 (d, $J=4,2$ Hz, 1 H), 4,65 (ddd, $J=12,2, 9,0, 2,2$ Hz, 1 H), 4,53 4,59 (m, 2 H), 4,43 4,48 (m, 1 H), 4,16 4,24 (m, 2 H)

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ 55,7 (s, 1P), 52,2 (s, 1P) ppm.

Ví dụ 2.2

Ví dụ 2.2 được điều chế theo cách tương tự với Ví dụ 2.1 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 2.4-c làm nguyên liệu ban đầu.

LC-MS (hệ C):

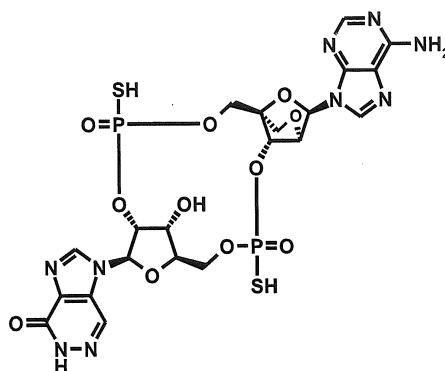
$t_{Ret} = 0,30$ phút; ESI-MS: 694 $[M+H]^+$

1H NMR (400 MHz, 303K, D_2O) δ ppm 8,80 (s, 1 H), 8,55 (s, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 6,44 (d, $J=15,0$ Hz, 1 H), 6,28 (d, $J=8,5$ Hz, 1 H), 5,54 5,73 (m, 1 H), 4,99 5,10 (m, 2 H), 4,64 4,70 (m, 1 H), 4,58 (d, $J=4,4$ Hz, 1 H), 4,52 4,57 (m, 2 H), 4,37 4,45 (m, 1 H), 4,22 (ddd, $J=12,3, 3,5, 1,1$ Hz, 1 H), 4,08 (ddd, $J=11,7, 3,6, 1,7$ Hz, 1 H)

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ 55,5 (s, 1P), 55,9 (s, 1P) ppm.

Ví dụ 3.1 và Ví dụ 3.2

Muối natri của (imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosit-(2' $\rightarrow$ 5')-phosphorothioat-LNA-adenin-(3' $\rightarrow$ 5')-phosphorothioat) vòng



Các Ví dụ 3.1 và 3.2 được điều chế theo cách tương tự với Ví dụ 2.1 và 2.2 bằng cách lần lượt sử dụng Hợp chất trung gian 3.4-d (với Ví dụ 3-1) và 3.4-c (với Ví dụ 3-2) làm nguyên liệu ban đầu.

Ví dụ 3.1:

LC-MS (hệ E):

$t_{\text{Ret}} = 0,37$ phút;

ESI-MS: 704 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, 303 K, D₂O) δ ppm 8,79 (s, 1 H), 8,53 (s, 1 H), 8,22 (s, 1 H), 7,95 (s, 1 H), 6,26 (d, J=8,4 Hz, 1 H), 6,14 (s, 1 H), 5,08 (s, 1 H), 4,97 (ddd, J=9,6, 8,4, 4,4 Hz, 1 H), 4,81 (d, J=5,4 Hz, 1 H), 4,82 4,70 (m, 3 H), 4,55 (d, J=2,0 Hz, 1 H), 4,35 (dd, J=11,9, 2,7 Hz, 1 H), 4,25 4,16 (m, 3 H), 4,08 (d, J=8,5 Hz, 1 H) ³¹P NMR (162 MHz, D₂O): δ 56,0 (s, 1P), 53,0 (s, 1P) ppm.

Ví dụ 3.2:

LC-MS (hệ E):

$t_{\text{Ret}} = 0,29$ phút;

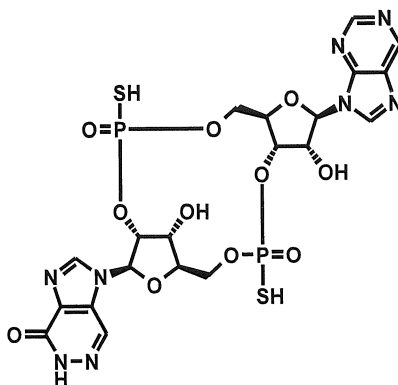
ESI-MS: 704 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, 303 K, D₂O) δ ppm 8,85 (s, 1 H), 8,56 (s, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 8,15 (s, 1 H), 6,26 (d, J=8,4 Hz, 1 H), 6,16 (s, 1 H), 5,20 (s, 1 H), 5,00 (ddd, J=13,0, 8,4, 4,5 Hz, 1 H), 4,87 (d, J=5,0 Hz, 1 H), 4,83 4,73 (m, 2 H), 4,62 (d, J=4,5 Hz, 1 H), 4,54 4,52 (m, 1 H), 4,47 (dd, J=11,3, 5,0 Hz, 1 H), 4,27 4,20 (m, 2 H), 4,12 (dd, J=11,3, 3,1 Hz, 1 H), 4,10 (d, J=8,5 Hz, 1 H).

³¹P NMR (162 MHz, D₂O): δ 57,3 (s, 1P), 55,8 (s, 1P) ppm.

Ví dụ 4.1 và Ví dụ 4.2

Muối natri của (imidazopyridazinon- β -D-ribofuranosít-(2'→5')-phosphorothioat-purin- β -D ribofuranosít-(3'→5')-phosphorothioat) vòng



Các Ví dụ 4.1 và 4,2 được điều chế theo cách tương tự với Ví dụ 1.1 và 1,2 bằng cách sử dụng Hợp chất trung gian 4.4-d và Hợp chất trung gian 4.4-c làm nguyên liệu ban đầu. Ngoài quá trình được mô tả với các Ví dụ 1.1 và 1,2, trước khi bắt đầu phản ứng, nguyên liệu ban đầu được tạo hỗn hợp đồng sôi một lần bằng cách sử dụng hỗn hợp pyridin khan và khan triethylamin với tỷ lệ 2:1.

Ví dụ 4.1:

HPLC (cấu hình B): $t_{Ret} = 10,22$ phút;

ESI-MS: 677 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, 318 K, 500 μ L (CD₃)₂SO + 30 μ L D₂O) δ 9,16 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 6,06 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,06 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 5,11 4,98 (m, 3H), 4,44 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,34 4,25 (m, 3H), 4,08 3,97 (m, 1H), 3,93 3,83 (m, 1H), 3,84 3,77 (m, 1H).

³¹P NMR (162 MHz, D₂O): δ 55,3 (s, 1P), 52,6 (s, 1P) ppm.

Ví dụ 4.2:

HPLC (cấu hình B): $t_{Ret} = 5,50$ phút;

ESI-MS: 677 [M+H]⁺

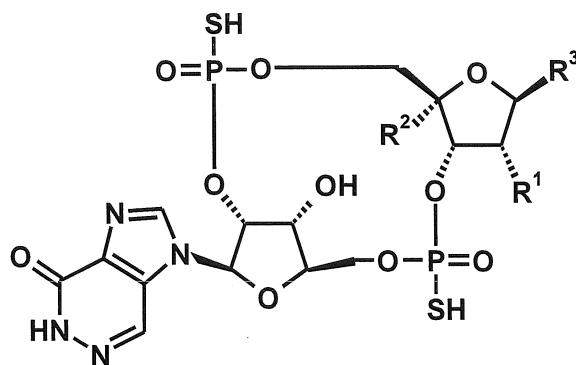
¹H NMR (400 MHz, 318 K, 500 μ L (CD₃)₂SO + 30 μ L D₂O) δ 9,16 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 6,04 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,03 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,30 (dd, J = 8,5, 4,3 Hz, 1H), 5,09 (ddd, J = 11,3, 8,4, 4,6 Hz, 1H), 5,01 (dd, J = 8,2, 4,3

Hz, 1H), 4,45 4,32 (m, 1H), 4,32 4,19 (m, 3H), 4,13 (dd, $J = 11,0, 4,1$ Hz, 1H), 3,84 3,75 (m, 1H), 3,71 3,61 (m, 1H).

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O): δ 55,8 (s, 1P), 57,8 (s, 1P) ppm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức I:



I,

trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm H, F, $-O-C_{1-3}\text{-alkyl}$ và OH, và

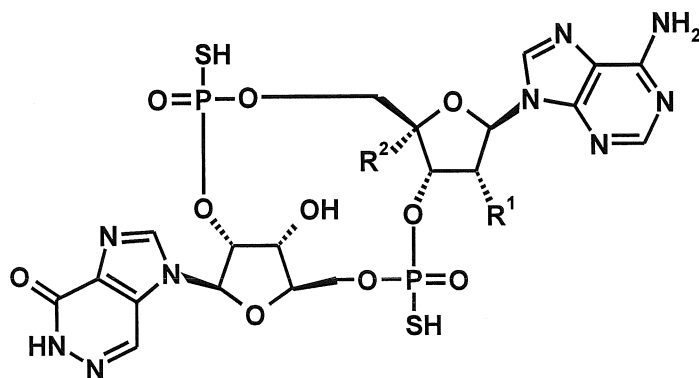
R^2 là H, hoặc

R^2 là $-CH_2-$ và R^1 là $-O-$, cùng nhau tạo thành cầu $-CH_2-O-$, và

R^3 là nucleobazơ purin được chọn từ nhóm bao gồm purin, adenin, guanin, xanthin, hypoxanthin, được nối qua nitơ N^9 của nó;

solvat hoặc hydrat của nó, hoặc muối của nó.

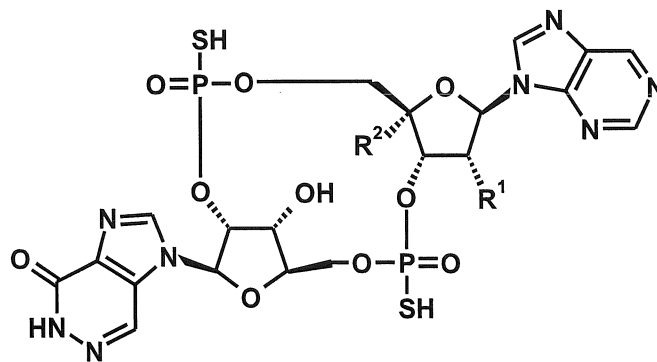
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức Ia:



Ia,

solvat hoặc hydrat của nó, hoặc muối của nó.

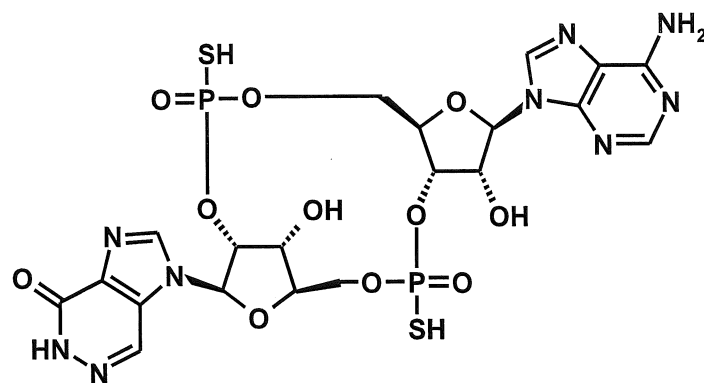
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức Ib:



Ib

solvat hoặc hydrat của nó, hoặc muối của nó.

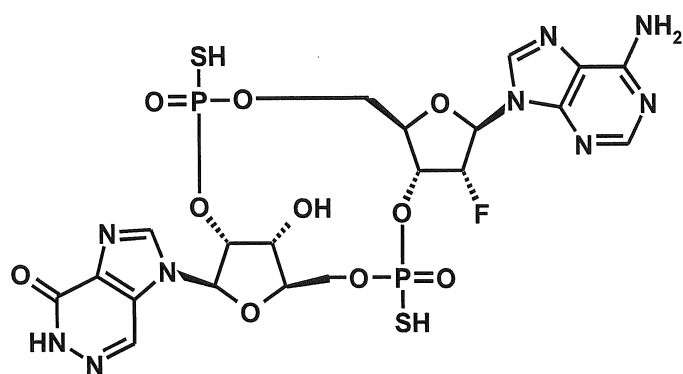
4. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này có công thức Ia.1:



Ia.1,

solvat hoặc hydrat của nó.

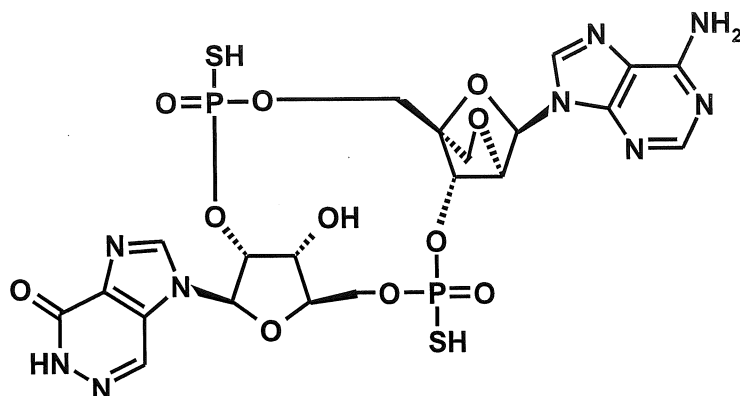
5. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này có công thức Ia.2:



Ia.2,

solvat hoặc hydrat của nó.

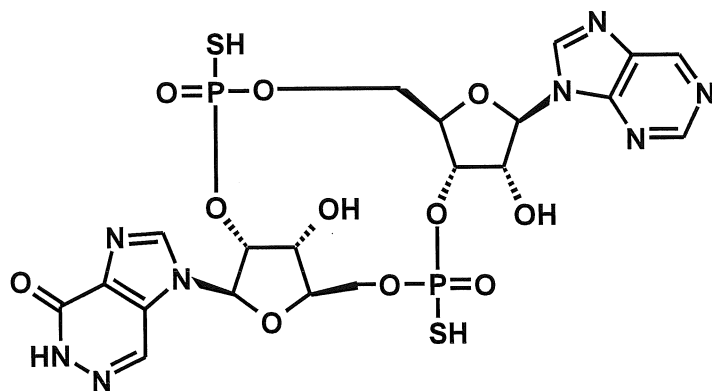
6. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này có công thức Ia.3:



Ia.3,

solvat hoặc hydrat của nó.

7. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất này có công thức Ib.1:



Ib.1

solvat hoặc hydrat của nó.

8. Chất đồng phân lập thể (Sp,Sp), (Rp,Rp), (Sp,Rp), hoặc (Rp,Sp) gần như tinh khiết của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chất này ít nhất tinh khiết 90% so với các chất đồng phân không đối quang có thể khác, hoặc muối của nó.
9. Chất đồng phân lập thể (Rp,Rp) gần như tinh khiết của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chất này ít nhất tinh khiết 90% so với các chất đồng phân không đối quang có thể khác, hoặc muối của nó.
10. Muối được dụng của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
11. Muối natri của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7.
12. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, hoặc một hoặc nhiều muối được dụng theo điểm 10, tùy ý với một hoặc nhiều chất mang và/hoặc chất pha loãng được dụng.
13. Vaccin bao gồm hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, hoặc muối được dụng theo điểm 10.
14. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, hoặc một hoặc nhiều muối được dụng theo điểm 10, và một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung, tùy ý với một hoặc nhiều chất mang và/hoặc chất pha loãng được dụng.
15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó dược phẩm này chứa một hoặc nhiều hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, hoặc một hoặc nhiều muối được dụng theo điểm 10, và một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung.