(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) **1-0048142**

(51)[2021.01] **A61P 35/00**; C07D 498/04; C07D 487/04; A61K 31/553

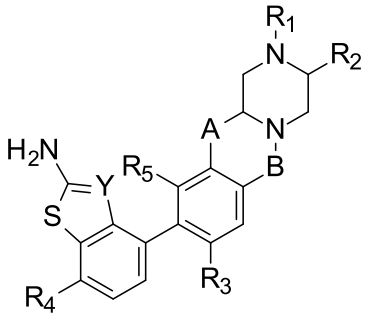
(13) **B**

(21) 1-2022-04091
(22) 04/12/2020
(86) PCT/US2020/063272 04/12/2020
(87) WO2021/118877 17/06/2021
(30) 62/946,586 11/12/2019 US
(45) 25/07/2025 448
(43) 26/09/2022 414A
(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) BOULET, Serge Louis (CA); FORTNER, Kevin Charles (US); GUO, Deqi (US); HYMAN, David Michael (US); PENG, Sheng-Bin (US); SI, Chong (CN).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT DỊ VÒNG BA VÒNG LÀM CHẤT ỨC CHẾ KRAS G12C VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(21) 1-2022-04091

(57) Sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức:



trong đó R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, A, B, và Y là như được mô tả trong bản mô tả, muối dược dụng của nó. Các hợp chất và muối này là hữu ích để điều trị bệnh nhân mắc ung thư. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm bao gồm hợp chất này hoặc muối dược dụng của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất dị vòng ba vòng và muối dược dụng của nó, dược phẩm bao gồm các hợp chất và muối này, và phương pháp sử dụng các hợp chất và muối này để điều trị bệnh ung thư ví dụ như ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tụy, ung thư bàng quang, ung thư cổ, ung thư màng trong tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư ống mật hoặc ung thư thực quản.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Con đường tín hiệu MAPK/ERK chuyển tiếp các kích thích ngoại bào đến nhân, do đó điều chỉnh các đáp ứng đa dạng của tế bào bao gồm tăng sinh, biệt hóa và chết theo chương trình của tế bào. Protein KRas là chất khởi đầu của lộ trình tín hiệu MAPK/ERK và có chức năng như một công tắc chịu trách nhiệm tạo ra sự phân chia tế bào. Ở trạng thái bất hoạt, KRas liên kết với guanosin diphosphat (GDP), gửi tín hiệu tiêu cực một cách hiệu quả để ngăn chặn sự phân chia tế bào. Để đáp ứng với tín hiệu ngoại bào, KRas được kích hoạt dị ứng cho phép trao đổi nucleotit trong GDP thành guanosin triphosphat (GTP). Ở trạng thái hoạt động gắn kết với GTP, KRas thu nhận và kích hoạt các protein cần thiết cho việc truyền tín hiệu do yếu tố tăng trưởng gây ra, cũng như các thụ thể tín hiệu tế bào khác. Ví dụ về các protein được KRas-GTP thu nhận là c-Raf và PI3-kinaza. KRas, với tư cách là một GTP-aza, chuyển đổi GTP bị ràng buộc trở lại GDP, do đó tự trở về trạng thái bất hoạt và truyền tín hiệu lại để ngăn chặn sự phân chia tế bào. Mức tăng KRas của các đột biến chức năng cho thấy mức độ liên kết GTP tăng lên và giảm khả năng chuyển đổi GTP thành GDP. Kết quả là tăng tín hiệu MAPK/ERK thúc đẩy sự phát triển của tế bào ung thư. Các đột biến sai nghĩa của KRas tại codon 12 là những đột biến phổ biến nhất và làm giảm rõ rệt hoạt động của GTPaza.

Các đột biến KRas gây ung thư đã được xác định trong khoảng 30% các trường hợp ung thư ở người và đã được chứng minh là có khả năng kích hoạt nhiều con đường truyền tín hiệu xuôi dòng. Bất chấp sự phổ biến của các đột biến KRas, nó vẫn là một đích điều trị khó khăn. (Cox, A.D. *Drugging the Undruggable RAS: Mission Possible?*

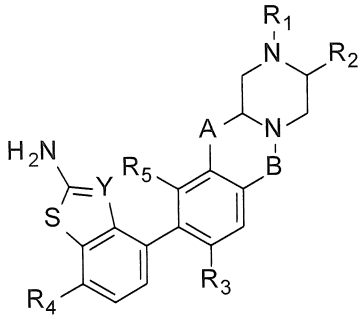
Nat. Rev. Drug Disc. 2014, 13, 828-851; Pylayeva-Gupta, y et al. *RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web.* Nat. Rev. Cancer 2011, 11, 761-774).

WO2015/054572 và WO2016/164675 bộc lộ một số dẫn xuất quinazolin có khả năng gắn kết với KRas G12C. WO2016/044772 cũng bộc lộ các phương pháp sử dụng các dẫn xuất quinazolin như vậy. WO2020/0081282 bộc lộ chất ức chế KRas G12C. WO2018/206539 và WO2020/178282 bộc lộ một số hợp chất heteroaryl nhất định có khả năng liên kết với protein KRas G12C RAS.

Vẫn có nhu cầu cung cấp các chất ức chế KRas phân tử nhỏ thay thế. Đặc biệt, cần phải cung cấp nhiều hơn các chất ức chế KRas có thể phân phối qua đường uống, hữu ích để điều trị ung thư. Đặc biệt hơn, cần cung cấp các chất ức chế phân tử nhỏ ức chế đặc hiệu hoạt tính của KRas GTP. Cũng cần cung cấp các chất ức chế KRas phân tử nhỏ thể hiện hiệu quả cao hơn ở cùng mức hoạt động ức chế Kras hoặc giảm. Hơn nữa, có mong muốn cung cấp các chất ức chế KRas thể hiện các đặc tính dược động học/dược lực học tốt hơn. Ngoài ra, cần phải cung cấp nhiều chất ức chế KRas mạnh hơn thể hiện hiệu quả tăng lên với các tác dụng không mong muốn hoặc không mong muốn được giảm hoặc giảm thiểu. Sáng chế giải quyết một hoặc nhiều nhu cầu này bằng cách cung cấp các chất ức chế KRas mới.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



Công thức I

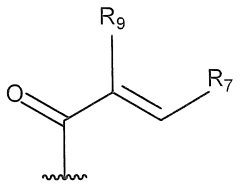
hoặc muối dược dụng của nó, trong đó:

A là $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, $-CH_2OCH_2-$, hoặc $-CH_2N(R_6)CH_2-$;

B là $-CH_2-$ hoặc -C(O)-;

Y là -C(CN)- hoặc -N-;

R_1 là -CN, $-C(O)C\equiv CR_8$, hoặc nhóm có công thức



;

R_2 là H, metyl, hoặc $-CH_2CN$;

mỗi gốc R_3 và R_5 độc lập là H, halogen, $-C_{0-3}$ alkyl-xyclopropyl, $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10}, hoặc $-O-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_4 là H, halogen, hoặc $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_6 là H hoặc $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_7 là H, halogen, $-NR_{11}R_{12}$, $-CH_2NR_{11}R_{12}$, $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10} hoặc R_{13}, $-C_{0-3}$ alkyl xyclopropyl, hoặc $-O-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10} hoặc R_{13};

R_8 là H, $-C_{1-4}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10}, hoặc $-C_{3-6}$ xycloalkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_9 là H, halogen, -CN, $-C_{0-3}$ alkyl-C_{3-6} xycloalkyl, hoặc $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_{10} tại mỗi lần xuất hiện độc lập là halogen, oxygen, hydroxy, $-C_{1-4}$ alkyl, hoặc $-O-C_{1-4}$ alkyl;

mỗi gốc R_{11} và R_{12} độc lập là H, $-C_{1-4}$ alkyl, hoặc $-C_{1-4}$ heteroalkyl, trong đó R_{11} và R_{12} có thể kết hợp để tạo thành heteroxycloalkyl; và

R_{13} tại mỗi lần xuất hiện độc lập là $-N-C_{1-4}$ alkyl.

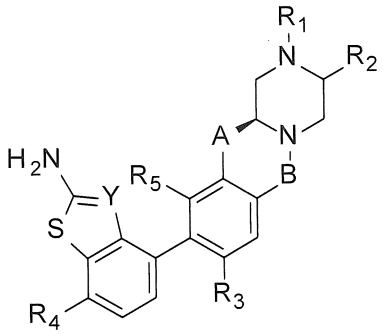
Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ halogen nghĩa là flo (F), clo (Cl), bromo (Br), hoặc iodo (I). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ alkyl có nghĩa là gốc hydrocacbon hóa trị một, mạch thẳng hoặc nhánh bão hòa có một

đến sáu nguyên tử cacbon, ví dụ, "-C_{1-6} alkyl." Ví dụ về alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl, etyl, propyl, 1-propyl, isopropyl, butyl, pentyl, và hexyl. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ heteroalkyl có nghĩa là gốc hydrocacbon hóa trị một, mạch thẳng hoặc nhánh bão hòa có chứa hai đến năm nguyên tử cacbon và ít nhất một nguyên tử khác loại, ví dụ, "-C_{1-4} heteroalkyl." Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ xycloalkyl có nghĩa là phân tử dạng vòng hóa trị một bão hòa có ba đến sáu nguyên tử cacbon, ví dụ, "-C_{3-6} xycloalkyl." Ví dụ về nhóm xycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, và xyclohexyl. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ xycloheteroalkyl có nghĩa là phân tử dạng vòng hóa trị một bão hòa có hai đến năm nguyên tử cacbon và ít nhất một nguyên tử khác loại, ví dụ, "-C_{3-6} xycloheteroalkyl." Ví dụ về nhóm xycloheteroalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pyrolidin, piperidin, imidazolidin, pyrazolidin, và piperazin.

Trong trường hợp số 0 được thể hiện, ví dụ, -C_{0-3} alkyl-C_{3-6} xycloalkyl, thành phần alkyl của nhóm thế có thể vắng mặt, do đó, nếu R_9 của Công thức I là nhóm xyclopropyl không có alkyl dẫn, phần tử thế này có thể được mô tả bằng phần tử thế -C_{0-3} alkyl-xyclopropyl như được mô tả đối với R_9 (nghĩa là, nhóm thế này có thể là -C_0-xyclopropyl).

Về R_{11} và R_{12}, hai nhóm này có thể kết hợp với nguyên tử nitơ mà chúng gắn vào khi đặc tính hóa học cho phép để tạo thành heteroxycloalkyl. Ví dụ về nhóm heteroxycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, piperidin, piperazin, và morpholin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức Ia:



Công thức Ia

trong đó R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, A, B, và Y là như được xác định trên đây, hoặc muối dược dụng của nó.

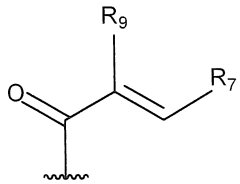
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$ hoặc $-OCH_2CH_2-$, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2CH_2-$, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó B là -C(O)-, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -C(CN)- hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -N-, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_1 là -CN, $-C(O)C\equiv CR_8$, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_1 là nhóm có công thức



,

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_2 là H hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_2 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_3 là H, halogen, metyl, metoxy, etyl, isopropyl, hoặc xyclopropyl, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_3 là halogen, (tốt hơn là F hoặc Cl), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_4 là H hoặc halogen, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_4 là H hoặc F, hoặc muối dược dụng của nó

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_5 là halogen (tốt hơn là Cl) hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc Ia, trong đó R_6 là H hoặc CH_3, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_9 là H, F, Cl, $-CH_2F$, $-CF_3$, hoặc $-CH_2OH$, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_9 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_7 là H, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, hoặc $-CH_2$ -morpholin, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_7 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

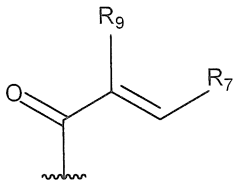
Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_9 là H và R_7 là H, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, hoặc $-CH_2$ -morpholin, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_9 là H, F, Cl, $-CH_2F$, $-CF_3$, hoặc $-CH_2OH$ và R_7 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó cả hai R_7 và R_9 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

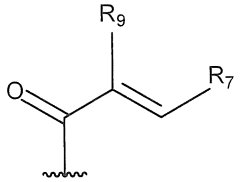
Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_1 là -CN, $-C(O)C{\equiv}CR_8$ và R_8 là H, metyl, $-CH_2F$, hoặc $-CH_2OH$ hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_1 là nhóm có công thức



và cả hai R_7 và R_9 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_1 là nhóm có công thức



và R_7 là tert-butyl và R_9 là -CN, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, và B là -C(O)-, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$ hoặc $-OCH_2CH_2-$ và B là -C(O)-, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2CH_2-$ và B là -C(O)-, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, B là C(O) và R_2 là H hoặc $-CH_3$, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$ hoặc $-OCH_2CH_2-$, B là -C(O)- và R_2 là H hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2CH_2-$, B là -C(O)- và R_2 là H hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là -OCH_2-, -$N(R_6)CH_2$-, -OCH_2CH_2-, -$N(R_6)CH_2CH_2$-, B là -C(O)- và R_2 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là -OCH_2- hoặc -OCH_2CH_2-, B là -C(O)- và R_2 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là -OCH_2CH_2-, B là -C(O)- và R_2 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là -OCH_2CH_2- và R_2 là H hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là -OCH_2CH_2- và R_2 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó B là -C(O)- và R_2 là H hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó B là -C(O)- và R_2 là H, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó mỗi gốc R_3 và R_5 độc lập được chọn từ H, halogen hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_3 hoặc R_5 là halogen, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó R_3 và R_5 là halogen, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó mỗi gốc R_3 và R_5 độc lập được chọn từ F hoặc Cl, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -C(CN)- và R_4 là H hoặc halogen (tốt hơn là F hoặc Cl), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -N- và R_4 là H hoặc halogen (tốt hơn là F hoặc Cl), hoặc muối dược dụng của nó.

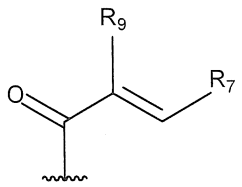
Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -C(CN)-, và mỗi gốc R_3 và R_5 độc lập được chọn từ metyl hoặc halogen, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -C(CN)-, và mỗi gốc R_3 và R_5 là halogen (tốt hơn là F hoặc Cl), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -N-, mỗi gốc R_3 và R_5 độc lập được chọn từ metyl hoặc halogen, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó Y là -N-, mỗi gốc R_3 và R_5 là halogen (tốt hơn là F hoặc Cl), hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia, trong đó A là $-OCH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, $-CH_2OCH_2-$, hoặc $-CH_2N(R_6)CH_2$; B là $-CH_2-$ hoặc -C(O)-; Y là -C(CN)- hoặc -N-; R_1 là -CN, $-C(O)C{\equiv}CR_8$, hoặc nhóm có công thức

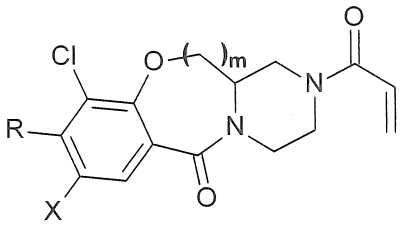


;

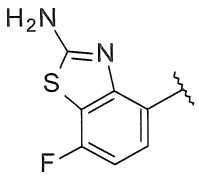
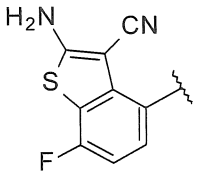
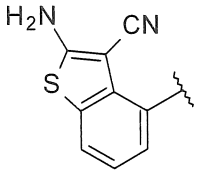
R_2 là H hoặc metyl; mỗi gốc R_3 và R_5 là H, F, Cl hoặc metyl; R_4 là H hoặc F; R_6 là H hoặc metyl; R_7 là H, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, $-CH_2$-morpholin hoặc tert-butyl; R_8 là metyl, $-CH_2F$ hoặc $-CH_2OH$; và R_9 là H, F, Cl, $-CH_2F$, $-CF_3$, $-CH_2OH$ hoặc CN; hoặc muối dược dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I hoặc Ia trong đó A là $-OCH_2-$ hoặc $-OCH_2CH_2-$; B là $-CH_2-$ hoặc -C(O)-; Y là -C(CN)- hoặc -N-; mỗi gốc R_2, R_7, và R_8 là H; R_4 là H hoặc halogen; mỗi gốc R_3 và R_5 là halogen; hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức II:



Công thức II

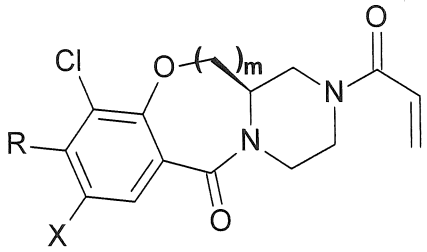
trong đó R là  ,  , hoặc  ;

X là Cl hoặc F;

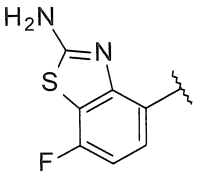
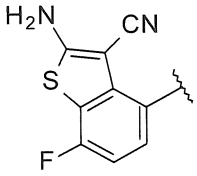
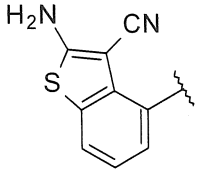
và m là 1 hoặc 2.

hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất có Công thức IIa:



Công thức IIa

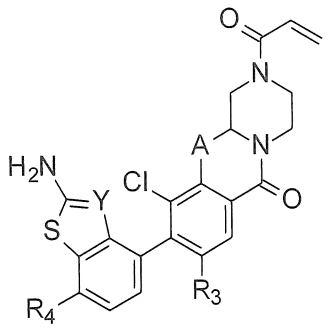
trong đó R là  ,  , hoặc  ;

X là Cl hoặc F;

và m là 1 hoặc 2.

hoặc muối dược dụng của nó.

Cách khác để mô tả hợp chất có Công thức II là bằng Công thức Ib:



Công thức Ib

hoặc muối dược dụng của nó, trong đó:

A là $-OCH_2-$ hoặc $-OCH_2CH_2-$;

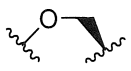
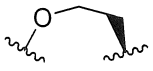
Y là -C(CN)- hoặc -N-;

R_3 là Cl hoặc F;

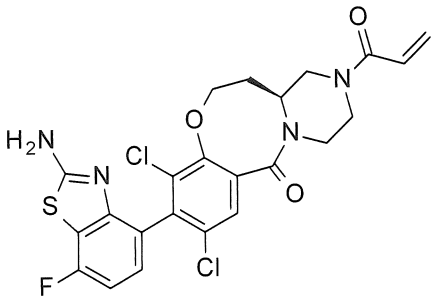
R_4 là H hoặc F khi Y là C(CN); và

R_4 là F khi Y là N.

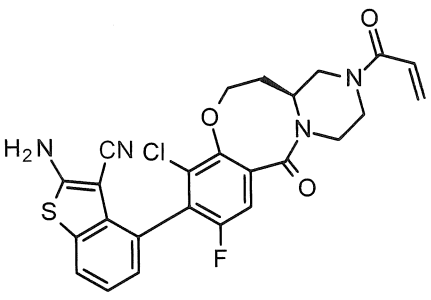
Cách khác để mô tả hợp chất có Công thức II là bằng Công thức Ib, trong đó A là

 hoặc  .

Sáng chế còn đề xuất hợp chất được chọn từ hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có Công thức III-VI dưới đây:

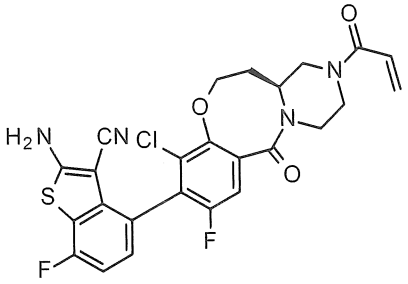


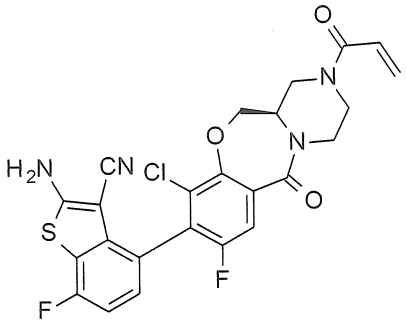
,



,

Công thức III Công thức IV



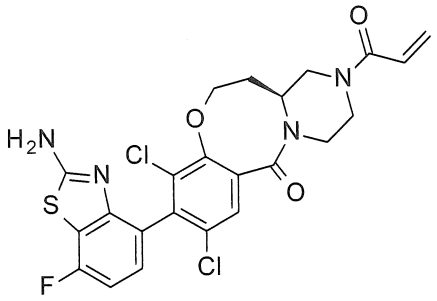


, hoặc ,

Công thức V Công thức VI

hoặc muối dược dụng của nó.

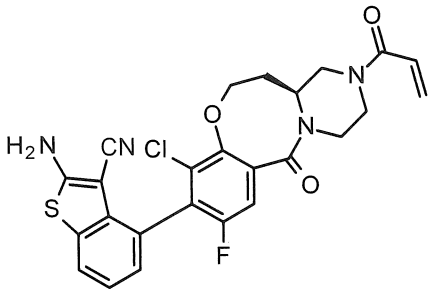
Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức III mà là:



Công thức III,

hoặc muối dược dụng của nó.

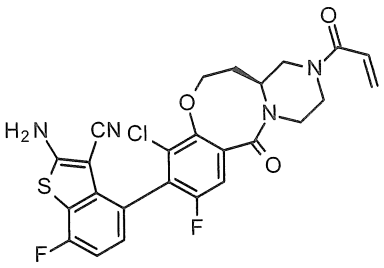
Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức IV mà là:



Công thức IV,

hoặc muối dược dụng của nó.

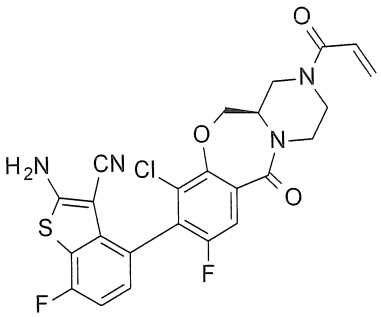
Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức V mà là:



Công thức V,

hoặc muối dược dụng của nó.

Theo dạng khác, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức VI mà là:



Công thức VI,

hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm, bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tụy, ung thư bàng quang, ung thư cổ, ung thư màng trong tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư ống mật, hoặc ung thư thực quản. Theo các phương án được ưu tiên, bệnh ung thư là ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư tuyến tụy, hoặc ung thư đại trực tràng. Theo các phương án được ưu tiên hơn nữa, bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ.

Theo dạng khác nữa, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác nữa, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhân mắc ung thư có đột biến KRAS G12C, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều hòa enzym đột biến KRas G12C ở bệnh nhân cần điều trị, bằng cách cho dùng hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó. Tốt hơn, nếu phương pháp này bao gồm: việc ức chế enzym đột biến KRas G12C của người.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư ở bệnh nhân cần điều trị, trong đó bệnh nhân này mắc ung thư được xác định có biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó. Trạng thái đột biến G12C của một hoặc nhiều tế bào ung thư có thể được xác định bằng vô số thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này. Thông thường, một hoặc nhiều mẫu sinh thiết có chứa một hoặc nhiều tế bào ung thư được lấy và trải qua quá trình giải trình tự và/hoặc phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR). ADN không tế bào tuần hoàn cũng có thể được sử dụng, ví dụ như trong các bệnh ung thư tiến triển. Các ví dụ không giới hạn về kỹ thuật xác định trình tự và PCR được sử dụng để xác định trạng thái đột biến (ví dụ: trạng thái đột biến G12C, trong một hoặc nhiều

tế bào ung thư hoặc trong ADN không tế bào tuần hoàn) bao gồm giải trình tự trực tiếp, giải trình tự thế hệ tiếp theo, phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược (RT-PCR), PCR đa mồi và giải trình tự bằng cách tổng hợp và lập hồ sơ đa phân tích.

Sáng chế còn đề xuất hợp chất hoặc muối dược dụng của nó có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI để sử dụng trong trị liệu. Hợp chất hoặc muối dược dụng của nó, có thể dùng để điều trị ung thư. Tốt hơn nếu, bệnh ung thư là ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tụy, ung thư bàng quang, ung thư cổ, ung thư màng trong tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư ống mật, hoặc ung thư thực quản. Theo các phương án được ưu tiên, ung thư là ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư tuyến tụy, hoặc ung thư đại trực tràng. Theo các phương án được ưu tiên hơn nữa, bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ. Theo các phương án khác, bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào ung thư biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Tốt hơn nếu, bệnh ung thư được chọn từ: ung thư phổi không phải tế bào nhỏ đột biến KRas G12C, ung thư đại trực tràng đột biến KRas G12C, và ung thư tuyến tụy đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, và một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư đại trực tràng, và một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy, và một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh nhân mắc ung thư được xác định có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C trước khi dùng hợp chất hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư. Tốt hơn nếu, bệnh ung thư là ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tụy, ung thư bàng quang, ung thư cổ, ung thư màng trong tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư ống mật, hoặc ung thư thực quản. Theo các phương án được ưu tiên, ung thư là ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư tuyến tụy, hoặc ung thư đại trực tràng. Theo các phương án được ưu tiên hơn nữa, bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ. Theo các phương án khác, bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào ung thư biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Tốt hơn nếu, bệnh ung

thư được chọn từ ung thư phổi không phải tế bào nhỏ đột biến KRas G12C, ung thư đại trực tràng đột biến KRas G12C, và ung thư tuyến tụy đột biến KRas G12C.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và một hoặc nhiều chất ức chế PD-1, chất ức chế PD-L1, chất ức chế CD4/CDK6, hoặc muối dược dụng của nó, chất ức chế EGFR, hoặc muối dược dụng của nó, chất ức chế ERK, hoặc muối dược dụng của nó, tác nhân platin, và pemetrexed, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp kết hợp với một hoặc nhiều chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1, chất ức chế CD4/CDK6, hoặc muối dược dụng của nó, chất ức chế EGFR, hoặc muối dược dụng của nó, chất ức chế ERK, hoặc muối dược dụng của nó, tác nhân platin, và pemetrexed, hoặc muối dược dụng của nó, để điều trị ung thư. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và một hoặc nhiều chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1, chất ức chế CD4/CDK6, hoặc muối dược dụng của nó, chất ức chế EGFR, hoặc muối dược dụng của nó, chất ức chế ERK, hoặc muối dược dụng của nó, tác nhân platin, và pemetrexed, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp kết hợp với chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1, để dùng để điều trị ung thư. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư. Theo một phương án, hợp chất là hợp chất có Công thức I-VI hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là

pembrolizumab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là nivolumab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là cimiplimab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là sintilimab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là atezolizumab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là avelumab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là durvalumab. Theo phương án khác, chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 là lodapilimab. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế CDK4/CDK6, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp kết hợp với chất ức chế CDK4/CDK6, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng để điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế CDK4/CDK6, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, chất ức chế CDK4/CDK6 là abemaciclib. Theo phương án khác, chất ức chế CDK4/CDK6 là palbociclib. Theo phương án khác, chất ức chế CDK4/CDK6 là ribociclib. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế

bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế EGFR, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp kết hợp với chất ức chế EGFR, hoặc muối dược dụng của nó, để điều trị ung thư. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế EGFR, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư. Theo một phương án, hợp chất này là hợp chất có Công thức I-VI hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, chất ức chế EGFR là erlotinib. Theo phương án khác, chất ức chế EGFR là afatinib. Theo phương án khác, chất ức chế EGFR là gefitinib. Theo phương án khác, chất ức chế EGFR là cetuximab. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế ERK, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp

kết hợp với chất ức chế ERK, hoặc muối dược dụng của nó, để điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và chất ức chế ERK, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư. Theo một phương án, hợp chất là hợp chất có Công thức I-VI hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, chất ức chế ERK là LY3214996. Theo phương án khác, chất ức chế ERK là LTT462. Theo phương án khác, chất ức chế ERK là KO-947. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và tác nhân platin, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp kết hợp với tác nhân platin, hoặc muối dược dụng của nó, để điều trị ung thư , trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và tác nhân platin, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư. Theo một phương án, hợp chất là hợp chất có Công thức I-VI hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, tác nhân platin là cisplatin. Theo phương án khác, tác nhân platin là carboplatin. Theo phương án khác, tác nhân platin là oxaliplatin. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh

ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và pemetrexed, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tiếp kết hợp với pemetrexed, để điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp bao gồm hợp chất có công thức bất kỳ trong số các Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó, và pemetrexed, để dùng đồng thời, riêng biệt, hoặc liên tiếp để điều trị ung thư, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo một phương án, hợp chất này là hợp chất có Công thức I-VI, hoặc muối dược dụng của nó. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, tác nhân platin còn được dùng cho bệnh nhân. Theo phương án khác, tác nhân platin là cisplatin. Theo phương án khác, tác nhân platin là carboplatin. Theo phương án khác, tác nhân platin là oxaliplatin. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư biểu mô đại trực tràng, trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, bệnh ung thư là ung thư tuyến tụy đột biến trong đó bệnh ung thư có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện protein đột biến KRas G12C. Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C có nguồn gốc khác.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "muối dược dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ muối của hợp chất được cho là chấp nhận được để sử dụng trong lâm sàng và/hoặc thú y. Các ví dụ về muối dược dụng và các phương pháp luận chung để điều chế chúng có

thể được tìm thấy trong "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" P. Stahl, *et al.*, 2nd Revised Edition, Wiley-VCH, 2011 và S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66(1), 1-19.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng các chất phụ gia dược dụng. Thuật ngữ "(các) chất phụ gia dược dụng" như được sử dụng ở đây cho dược phẩm, để chỉ một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, và tá dược tương thích với các chất phụ gia khác của dược phẩm hoặc công thức phối chế và không làm tổn hại cho bệnh nhân. Ví dụ về dược phẩm và các quy trình điều chế dược phẩm này có thể được tìm thấy trong tài liệu chuyên ngành "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V., *et al.* Eds., 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Các ví dụ không giới hạn về các chất mang dược dụng, chất pha loãng và tá dược bao gồm các chất sau: nước muối, nước, tinh bột, đường, mannitol, và dẫn xuất silic dioxit; chất kết dính như carboxymetyl xeluloza, alginat, gelatin, và polyvinyl-pyrolidon; kaolin và bentonit; và polyetyl glycol.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" dùng để chỉ lượng là dạng liều, mà là hữu hiệu để điều trị rối loạn hoặc bệnh, chẳng hạn như tổn thương ung thư hoặc sự tiến triển của sự phát triển tế bào bất thường và/hoặc sự phân chia tế bào. Bác sĩ chăm sóc, với tư cách là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, có thể dễ dàng xác định một lượng hữu hiệu bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường và bằng cách quan sát kết quả thu được trong các trường hợp tương tự. Liều lượng điều trị mỗi ngày thường nằm trong khoảng từ khoảng 1 mg mỗi ngày hoặc hai lần mỗi ngày đến 1000 mg mỗi ngày hoặc hai lần mỗi ngày, tốt hơn là từ 100 mg mỗi ngày hoặc hai lần mỗi ngày đến 900 mg mỗi ngày hoặc hai lần mỗi ngày. Các yếu tố được xem xét để xác định lượng hữu hiệu hoặc liều lượng của hợp chất bao gồm: khi hợp chất hoặc muối của nó sẽ được sử dụng; thì có sử dụng đồng thời các chất khác hay không, nếu được sử dụng; các loài bệnh nhân được điều trị; kích thước, độ tuổi và sức khỏe chung của bệnh nhân; mức độ liên quan hoặc tình trạng và/hoặc mức độ nghiêm trọng của rối loạn; phản ứng của từng bệnh nhân; phương thức sử dụng; đặc điểm sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; chế độ liều đã chọn; và việc sử dụng đồng thời thuốc khác.

Bác sĩ điều trị, bác sĩ thú y hoặc nhân viên y tế khác sẽ có thể xác định lượng hợp chất hiệu quả để điều trị cho bệnh nhân cần điều trị. Các dược phẩm được ưu tiên có thể được bào chế dưới dạng viên nén hoặc viên nang để dùng qua đường miệng, dung dịch để uống hoặc dưới dạng dung dịch tiêm. Viên nén, viên nang, hoặc dung dịch này có thể chứa hợp chất theo sáng chế với lượng hữu hiệu để điều trị cho bệnh nhân cần điều trị bệnh ung thư.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "điều trị", "để điều trị", hoặc "việc điều trị", bao gồm việc làm chậm, làm giảm, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nặng của triệu chứng, rối loạn, tình trạng bệnh hiện có, mà có thể bao gồm làm chậm một cách rõ ràng sự phát triển của tổn thương ung thư hoặc sự tiến triển của sự phát triển tế bào bất thường và/hoặc sự phân chia tế bào..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh nhân" được dùng để chỉ động vật có vú cần điều trị. Tốt hơn nếu, bệnh nhân là người cần điều trị ung thư, ví dụ, bệnh ung thư mang thể đột biến KRas G12C.

Các ký hiệu viết tắt nhất định được định nghĩa dưới đây: "ACN" dùng để chỉ axetonitril; AIBN" dùng để chỉ azobisisobutyronitril; "Boc-Gly-OH" dùng để chỉ *N*-(*tert*-butoxycacbonyl)glyxin; "DCM" dùng để chỉ diclometan; "DIEA" dùng để chỉ N,N-diisopropyl etylamin; "DMAP" dùng để chỉ 4-dimetylaminopyridin; "DMEM" dùng để chỉ môi trường Eagle cải biến bằng Dulbecco; "DMF" dùng để chỉ N,N-dimetylformamit; "DMSO" dùng để chỉ dimetylsulfoxit; "DNA" dùng để chỉ axit deoxyribonucleic; "DPEPhosPdCl_2" dùng để chỉ diclobis(diphenylphophinophenyl)ete paladi (II); "DTT" dùng để chỉ dithiothreitol; "EDTA" dùng để chỉ axit etylendiamintetraaxetic; "EGTA" dùng để chỉ axit etylen glycol-bis(□-aminoetyl ete)-N,N,N',N'-tetraaxetic; "ELISA" dùng để chỉ phương pháp hấp phụ miễn dịch dùng enzym; "ERK" dùng để chỉ kinaza điều chỉnh tín hiệu ngoại bào; "EtOAc" dùng để chỉ etyl axetat; "EtOH" dùng để chỉ etanol; "FBS" dùng để chỉ huyết thanh bào thai bê; "GDP" dùng để chỉ guanosin diphosphat; "GTP" dùng để chỉ guanosin triphosphat; "HPLC" dùng để chỉ sắc ký lỏng hiệu năng cao; "HRP" dùng để chỉ peroxidaza cải ngựa; "IPA" dùng để chỉ rượu isopropylic; "IPAm" dùng để chỉ isopropyl amin; "LC-ES/MS" dùng để chỉ phổ khối/phun điện-sắc ký lỏng; "LC-MS" dùng để chỉ phổ khối-sắc ký lỏng; "MAPK" dùng để chỉ protein kinaza được

hoạt hóa bằng mitogen; "MeOH" dùng để chỉ metanol; "NaOMe" dùng để chỉ natri metoxit; "NBS" dùng để chỉ N-bromosucxinimit; "NCS" dùng để chỉ N-closucxinimit; "NMP" dùng để chỉ 1-metylpyrolidin-2-on; "PCR" dùng để chỉ phản ứng chuỗi polymeraza; "RPMI" dùng để chỉ Roswell Park Memorial Institute; "SCX" dùng để chỉ sự trao đổi cation mạnh; "TEA" dùng để chỉ trietylamin; "TFA" dùng để chỉ axit trifluoraxetic; và "THF" dùng để chỉ tetrahydrofuran.

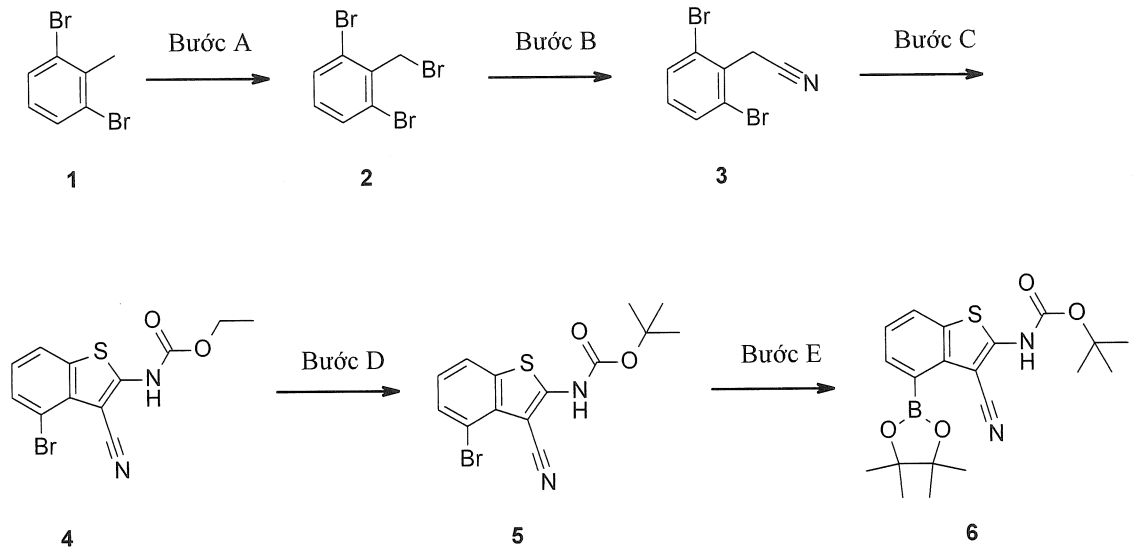
Các chất đồng phân, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang và chất đồng phân atropi riêng rẽ có thể được phân tách hoặc tách ở thời điểm thuận lợi bất kỳ trong quá trình tổng hợp các hợp chất được nêu dưới đây, bằng các phương pháp như, kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký bất đối (Xem ví dụ, J. Jacques, et al., "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen," *Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994). Sáng chế bao gồm một số hợp chất nhất định, là chất đồng phân atropi và có thể tồn tại dưới dạng các conforme khác nhau hoặc dưới dạng các chất đồng phân quay khác nhau. Chất đồng phân atropi là hợp chất tồn tại trong các cấu trúc khác nhau phát sinh từ sự quay bị hạn chế xung quanh một liên kết đơn. Chất đồng phân atropi có thể được tách thành các loại hóa chất riêng biệt nếu rào cản năng lượng để quay xung quanh liên kết đơn đủ cao và tốc độ chuyển đổi giữa các chất đủ chậm để cho phép các chất đồng phân quay được tách riêng biệt khỏi nhau. Sáng chế bao hàm tất cả các chất đồng phân, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang, và chất đồng phân atropi được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc có thể được điều chế bằng cách sử dụng hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả.

Hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có Công thức I-VI dễ dàng được chuyển hóa thành và có thể được tách dưới dạng muối dược dụng. Sự hình thành muối có thể xảy ra khi bổ sung axit dược dụng để tạo thành muối cộng axit. Các muối cũng có thể tạo thành một cách đồng thời khi loại bảo vệ nitơ hoặc oxy, *tức là*, loại bỏ nhóm bảo vệ. Ví dụ, phản ứng và điều kiện hình thành muối có thể tìm thấy trong Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., *et al.* "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and*

Development, 4: 427-435 (2000); và Berge, S.M., *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977).

Các hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của nó có thể được điều chế bằng nhiều quy trình khác nhau, một số quy trình trong đó được minh họa trong phần Quy trình điều chế và Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể đối với mỗi trong số các con đường được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau, hoặc cùng với các bước từ các con đường khác, để điều chế các hợp chất hoặc các muối theo sáng chế. Các sản phẩm của mỗi bước trong phần Ví dụ điều chế dưới đây có thể được thu lại bằng các phương pháp thông thường, bao gồm chiết, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền, và kết tinh.

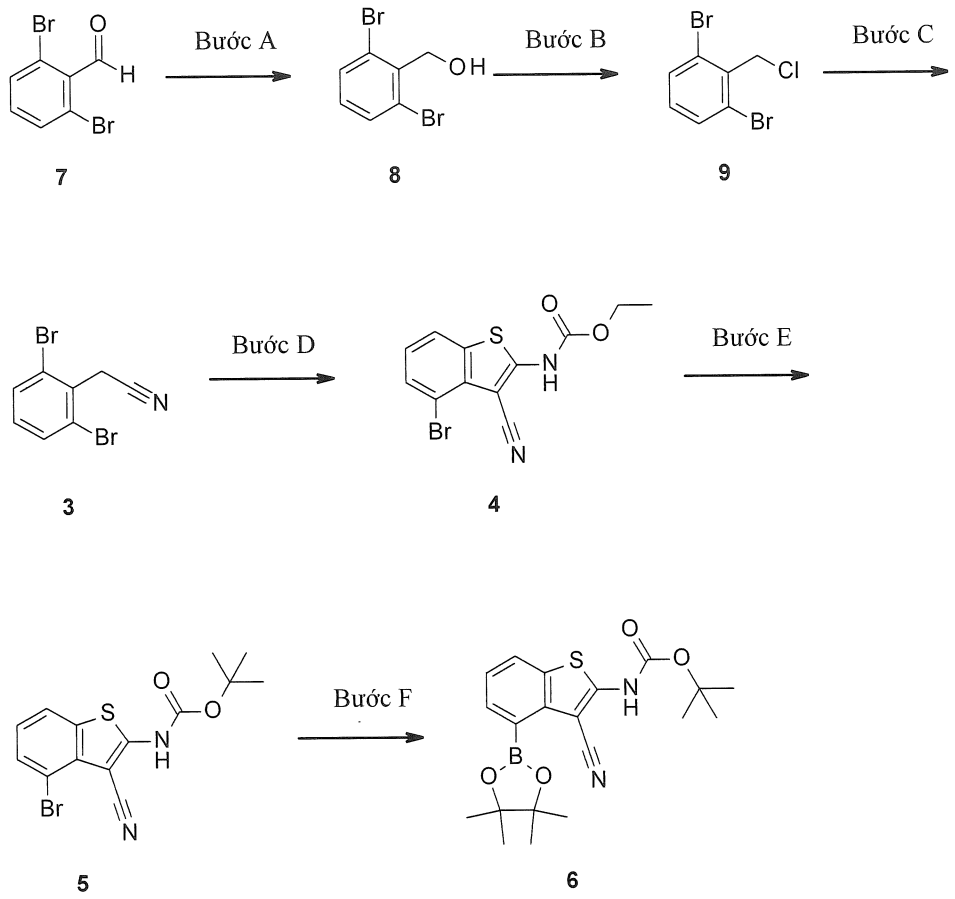
Sơ đồ 1



Sơ đồ 1, bước A mô tả việc brom hóa hợp chất (1) bằng cách sử dụng NBS và AIBN trong dung môi thích hợp, ví dụ như CCl_4 để tạo ra hợp chất (2). Bước B thể hiện việc thế ái nhân trên hợp chất (2) bằng cách sử dụng kali xyanua hồi lưu trong hệ dung môi thích hợp, ví dụ như EtOH và nước để tạo ra hợp chất (3). Việc bổ sung etoxycacbonyl isothioxyanat vào hợp chất (3) bằng cách sử dụng natri hydrua trong dung môi thích hợp, ví dụ như DMF và tiếp theo đóng vòng thành hợp chất (4) được thể hiện ở bước C. Việc khử nhóm bảo vệ bazơ của hợp chất (4) bằng dung dịch nước NaOH trong DMSO hồi lưu và tiếp theo tái bảo vệ bằng cách sử dụng di-*tert*-butyl dicacbonat bằng bazơ thích hợp, ví dụ như DIEA và DMAP xúc tác trong hệ dung

môi, ví dụ như THF và DMF để tạo ra hợp chất (5) được mô tả ở bước D. Bước E thể hiện phản ứng giữa brom của hợp chất (5) với bis(pinacolato)dibo bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như kali axetat và hệ phối tử-xúc tác, ví dụ như paladi axetat và 1,1'-bis(diisopropylphosphino)feroxen trong dung môi thích hợp ví dụ như 1,4-dioxan để tạo ra hợp chất (6). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng các loại tổ hợp xúc tác-phối tử khác nhau có thể được sử dụng để thực hiện phản ứng này.

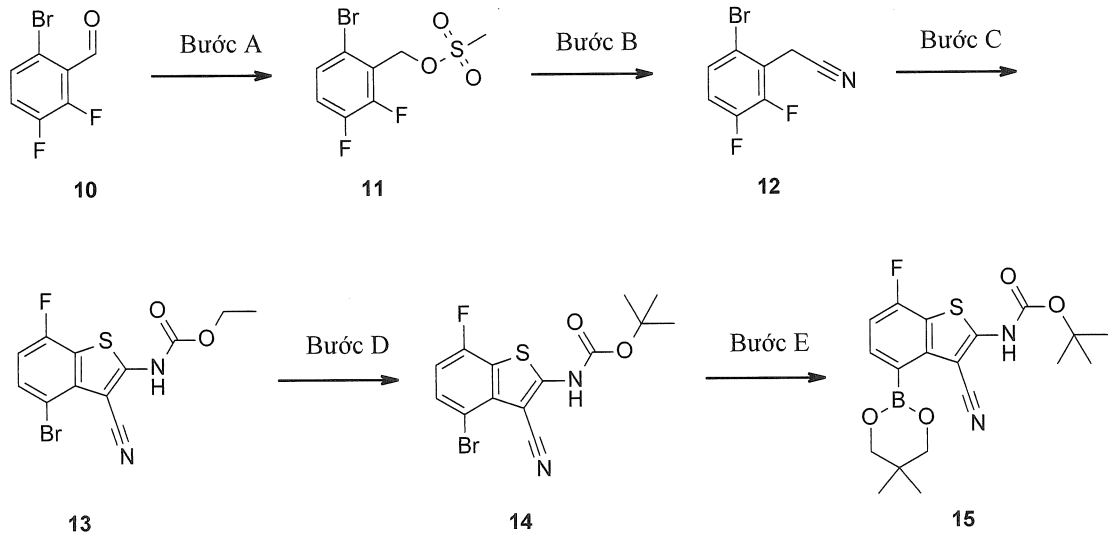
Sơ đồ 2



Sơ đồ 2 minh họa phương pháp khác để tổng hợp hợp chất (6). Bước A mô tả việc khử benzaldehyt (7) bằng cách sử dụng chất khử thích hợp, ví dụ như natri bohydrua trong dung môi thích hợp, ví dụ như EtOH để tạo ra hợp chất (8). Bước B thể hiện quá trình clo hóa hợp chất (8) bằng cách sử dụng thionyl clorua trong dung môi thích hợp, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (9). Bước C mô tả việc thế ái nhân trên hợp chất (9) bằng cách sử dụng kali xyanua trong dung môi thích hợp, ví dụ như

DMSO để tạo ra hợp chất (3). Việc bổ sung etoxycacbonyl isothioxyanat vào hợp chất (3) bằng cách sử dụng natri hydrua trong dung môi thích hợp, ví dụ như DMF và tiếp theo đóng vòng bằng cách sử dụng L-prolin và CuI để tạo ra hợp chất (4) được thể hiện ở bước D. The việc khử nhóm bảo vệ bazơ của hợp chất (4) bằng dung dịch nước NaOH trong DMSO hồi lưu và tiếp theo, tái bảo vệ bằng cách sử dụng di-*tert*-butyl dicacbonat bằng bazơ thích hợp, ví dụ như DIEA và DMAP xúc tác trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (5) được mô tả ở bước E. Bước F thể hiện phản ứng của brom của hợp chất (5) với bis(pinacolato)dibo bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như kali axetat và hệ phối tử-xúc tác ví dụ như paladi axetat và bis(2-diphenylphosphinophenyl)ete trong dung môi thích hợp ví dụ như 1,4-dioxan để tạo ra hợp chất (6). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng các loại tổ hợp xúc tác-phối tử khác nhau có thể được sử dụng để thực hiện phản ứng này.

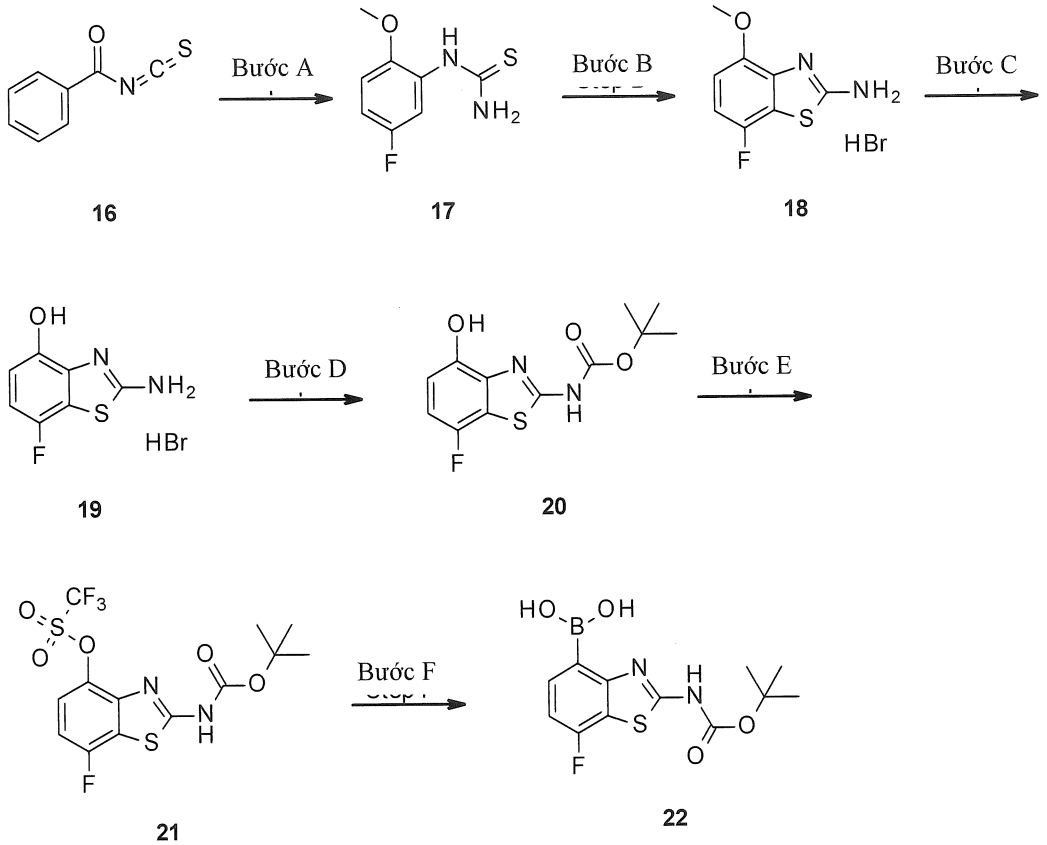
Sơ đồ 3



Sơ đồ 3, bước A mô tả việc khử hợp chất (10) aldehyt with natri bohydrua trong MeOH và tiếp theo mesyl hóa bằng cách sử dụng metan sulfonic anhydrit bằng bazơ thích hợp, ví dụ như DIEA trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (11). Các điều kiện được sử dụng để chuyển hóa hợp chất (11) thành hợp chất (12) gần như tương tự với các điều kiện được nêu trên Sơ đồ 1, bước B. Việc bổ sung etoxycacbonyl isothioxyanat vào hợp chất (12) bằng cách sử dụng kali *tert*-butoxit trong dung môi thích hợp, ví dụ như DMF và tiếp theo đóng vòng thành hợp chất (13) được thể hiện

ở bước C. Các điều kiện được sử dụng để chuyển hóa hợp chất (13) thành hợp chất (14) gần như tương tự với các điều kiện được nêu trên Sơ đồ 1, bước D. Bước E thể hiện phản ứng của brom của hợp chất (14) với bis(neopentylglycolato)dibo bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như kali axetat và hệ phối tử-xúc tác, ví dụ như DPEPhosPdCl2 trong dung môi thích hợp, ví dụ như 1,4-dioxan để tạo ra hợp chất (15). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng các loại tổ hợp xúc tác-phối tử khác nhau có thể được sử dụng để thực hiện phản ứng này.

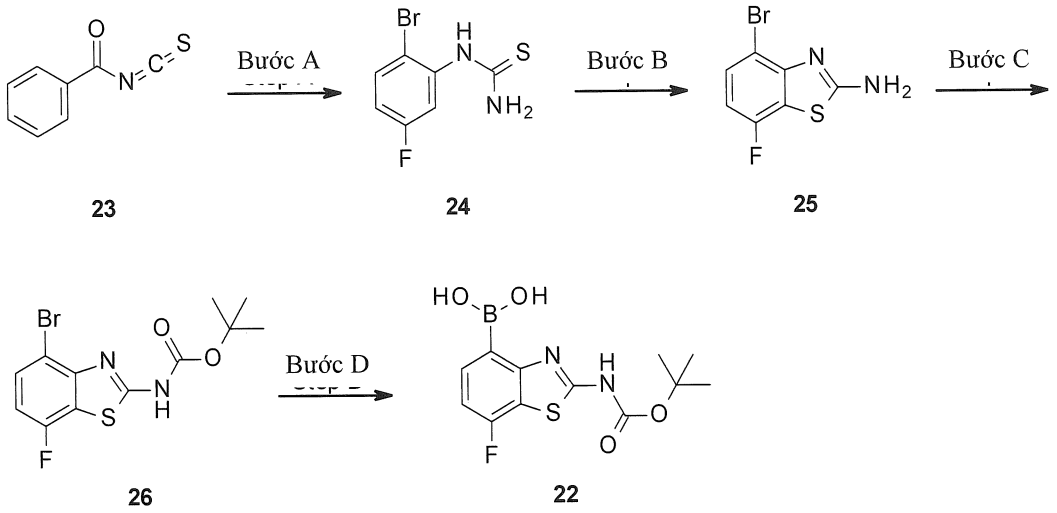
Sơ đồ 4



Sơ đồ 4, bước A mô tả việc tạo thành thioure từ phản ứng giữa hợp chất (16) và 5-flo-2-metoxyanilin, trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng mát, tiếp theo là việc khử nhóm bảo vệ bazơ để thu được hợp chất (17). Bước B thể hiện việc đóng vòng hợp chất (17) trong clorofom sau bổ sung brom để tạo ra hợp chất (18). Bước C mô tả việc khử metyl của hợp chất (18) mà có thể đạt được bằng cách bổ sung BBr_3 trong khi duy trì hỗn hợp phản ứng lạnh trong môi trường trơ để tạo ra hợp chất (19). Bước D thể hiện việc bảo vệ hợp chất (19) bằng di-*tert*-butyl dicacbonat bằng cách sử dụng bazơ

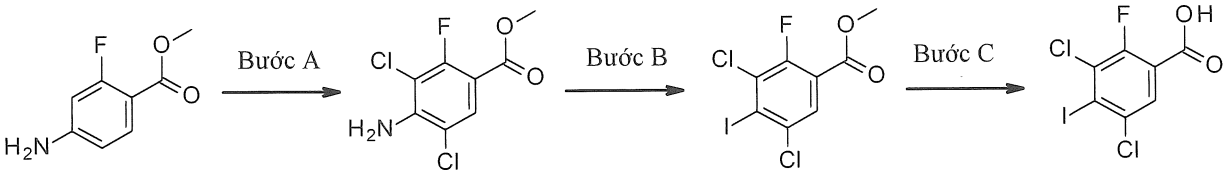
thích hợp, ví dụ như TEA và DMAP xúc tác trong hệ dung môi, ví dụ như 1,4-dioxan để tạo ra hợp chất (20). Hợp chất (20) được xử lý bằng bazơ, ví dụ như pyridin, tiếp theo là triflometansulfonic anhydrit trong dung môi, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (21) như được thể hiện là bước E. Bước F mô tả phản ứng của triflat của hợp chất (21) với bis(pinacolato)dibo bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như kali axetat và xúc tác, ví dụ như tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) trong dung môi thích hợp, ví dụ như 1,4-dioxan để tạo ra hợp chất (22). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng các loại tổ hợp xúc tác-phối tử khác nhau có thể được sử dụng để thực hiện phản ứng này.

Sơ đồ 5



Sơ đồ 5 minh họa phương pháp khác để tổng hợp hợp chất (22). Bước A mô tả việc tạo thành thioure từ phản ứng giữa hợp chất (23) với 2-bromo-5-floanilin trong dung môi, ví dụ như THF, tiếp theo là việc khử nhóm bảo vệ bazơ để thu được hợp chất (24). Bước B thể hiện việc brom hóa và đóng vòng hợp chất (24) bằng cách sử dụng chất bom hóa thích hợp, ví dụ như pyridini tribromua trong dung môi, ví dụ như axit sulfuric để tạo ra hợp chất (25). Bước C thể hiện việc bảo vệ hợp chất (25) bằng di-*tert*-butyl dicacbonat bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như DMAP trong hệ dung môi, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (26). Bước D mô tả việc chuyển hóa hợp chất (26) thành hợp chất (22) bằng cách xử lý bằng natri hydrua trong dung môi, ví dụ như THF ở nhiệt độ thấp, tiếp theo là bổ sung n-butyllithi và triisopropyl borat.

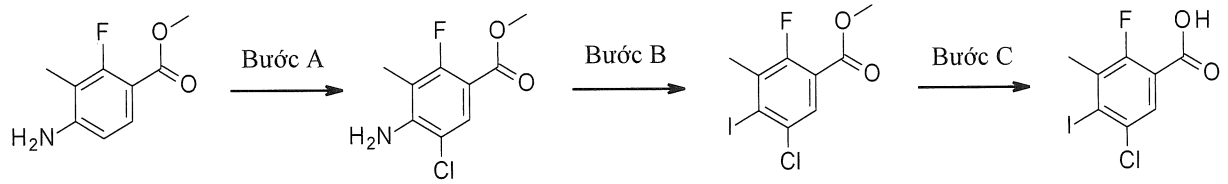
Sơ đồ 6



27 28 29 30

Sơ đồ 6, bước A mô tả việc clo hóa hợp chất (27) bằng NCS trong dung môi thích hợp, ví dụ như DMF để tạo ra hợp chất (28). Bước B thể hiện phản ứng Sandmeyer để chuyển hóa nitơ anilin của hợp chất (28) thành iot, điều kiện của nó sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến, để tạo ra hợp chất (29). Bước C thể hiện việc thủy phân bazơ este của hợp chất (29) thành axit của hợp chất (30).

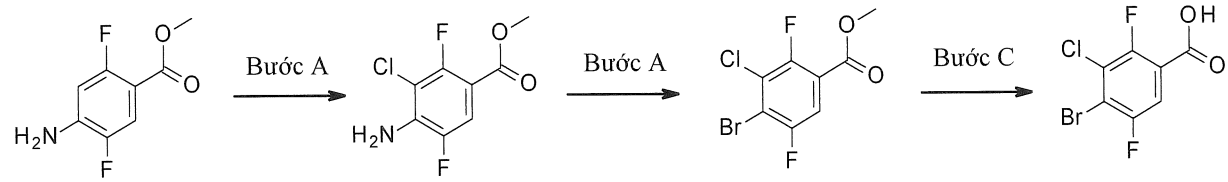
Sơ đồ 7



31 32 33 34

Sơ đồ 7, bướcs A-C được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước A-C của Sơ đồ 6 để tạo ra các hợp chất (32-34).

Sơ đồ 8

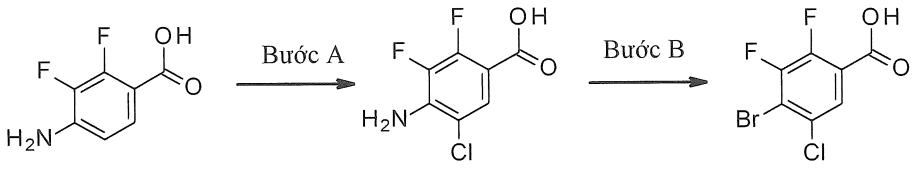


35 36 37 38

Sơ đồ 8, bước A được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước A của Sơ đồ 6 để tạo ra hợp chất (36). Bước B thể hiện phản ứng Sandmeyer để chuyển hóa nitơ anilin của hợp chất (36) thành brom, điều kiện của

nó sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến, để tạo ra hợp chất (37). Bước C được tiến hành được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước C của Sơ đồ 6 để tạo ra hợp chất (38).

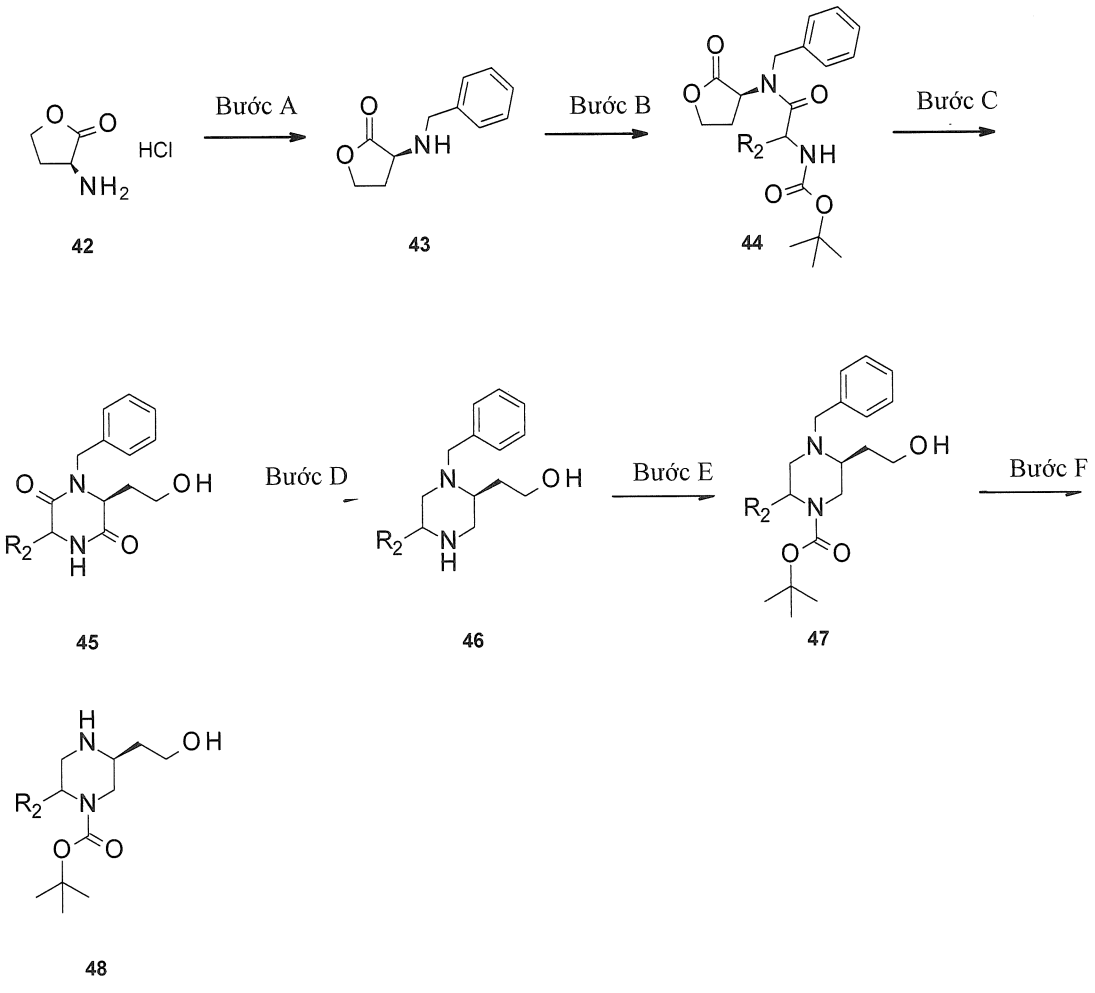
Sơ đồ 9



39 40 41

Sơ đồ 9, bước A được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước A của Sơ đồ 6 để tạo ra hợp chất (40). Bước B được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước B của Sơ đồ 8 để tạo ra hợp chất (41).

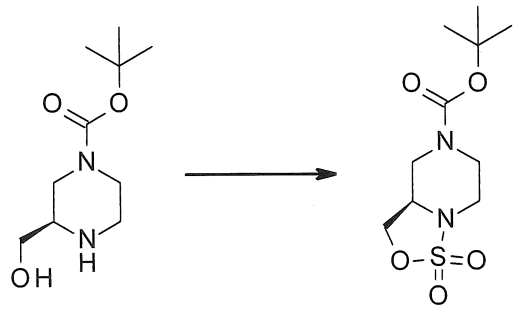
Sơ đồ 10



42 43 44 45 46 47 48

Sơ đồ 10, bước A mô tả việc amin hóa khử giữa hợp chất (42) và benzaldehyt trong dung môi thích hợp, ví dụ như DCM bằng chất khử thích hợp, ví dụ như natri triaxetoxybohydrua để tạo ra hợp chất (43). Bước B thể hiện việc liên hợp amit giữa hợp chất (43) và axit amin được bảo vệ boc bằng cách sử dụng propylphosphonic anhydrit bằng bazơ thích hợp, ví dụ như TEA trong dung môi, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (44). Bước C mô tả việc khử nhóm bảo vệ axit và tái sắp xếp hợp chất (44) bằng cách sử dụng TFA trong dung môi, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (45). Bước D thể hiện việc khử amit toàn cầu hợp chất (45) bằng cách sử dụng chất khử, ví dụ như lithi nhôm hydrua trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (46). Bước E mô tả việc bảo vệ hợp chất (46) bằng cách sử dụng di-*tert*-butyl dicacbonat trong dung dịch nước natri bicacbonat để tạo ra hợp chất (47). Bước F thể hiện việc khử nhóm bảo vệ của hợp chất (47) bằng cách hydro hóa để tạo ra hợp chất (48).

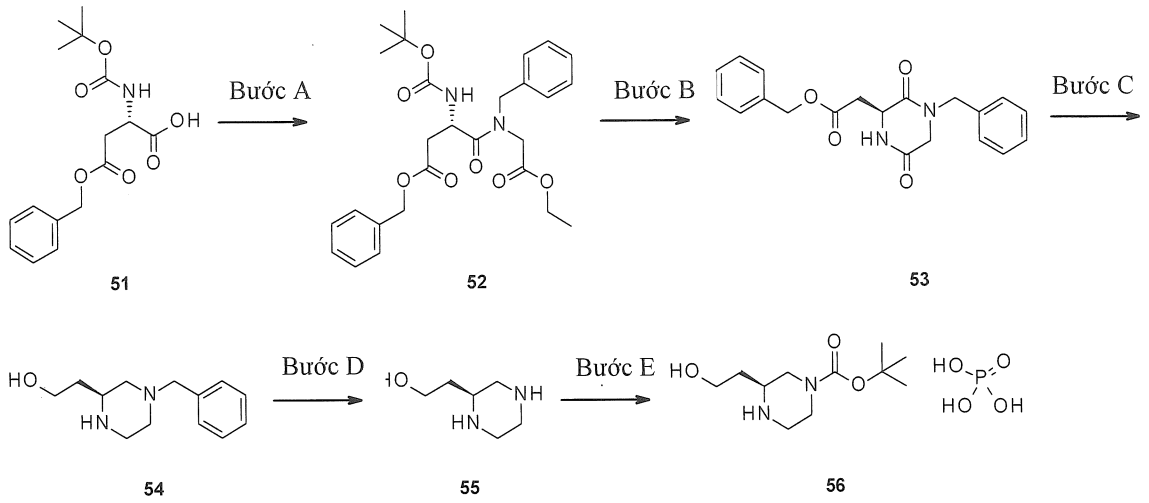
Sơ đồ 11



49 **50-R**

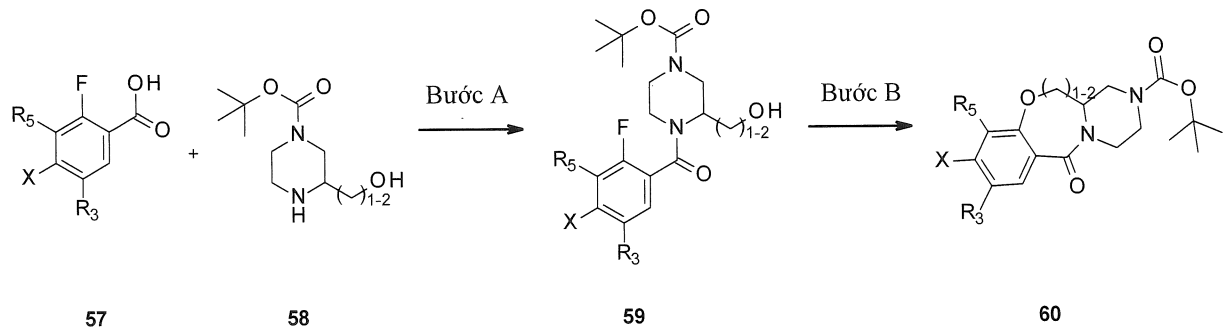
Sơ đồ 11 thể hiện việc đóng vòng hợp chất (49) bằng cách sử dụng thionyl clorua và imidazol trong dung môi, ví dụ như DCM ở -78 °C, tiếp theo là xử lý bằng natri periodat và rutheni (III) clorua trong ACN để tạo ra hợp chất (50-R). Chất đồng phân đối ảnh S (50-S) được tổng hợp bằng cách sử dụng cùng điều kiện.

Sơ đồ 12



Trên Sơ đồ 12, bước A, việc liên hợp amit được thể hiện giữa hợp chất (51) và benzylglyxin etyl este bằng cách sử dụng chất liên hợp thích hợp, ví dụ như N,N'-dixyclohexylcarbodiimit trong dung môi, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (52). Bước B mô tả việc đóng vòng hợp chất (52) thành hợp chất (53) bằng cách sử dụng axit, ví dụ như TFA trong dung môi, ví dụ như DCM. Bước C mô tả việc khử amit toàn cầu và việc khử nhóm bảo vệ của hợp chất (53) bằng chất khử, ví dụ như lithi nhôm hydrua trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (54). Bước D thể hiện việc hydro hóa hợp chất (54) thành hợp chất (55) bằng cách sử dụng xúc tác thích hợp, ví dụ như $Pd(OH)_2$ trong dung môi, ví dụ như MeOH. Bước E mô tả việc bảo vệ di-*tert*-butyl dicacbonat hợp chất (55) và tiếp theo, tạo muối với axit phosphoric để tạo ra hợp chất (56).

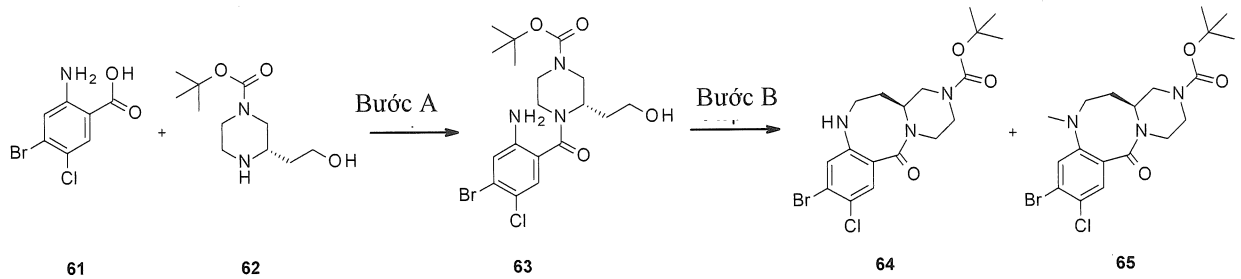
Sơ đồ 13



Trên Sơ đồ 13, hợp chất (57) là axit benzoic từ các Sơ đồ 6-9 cũng như axit benzoic có bán trên thị trường. Việc liên hợp amit giữa hợp chất (57) và hợp chất (58)

bằng cách sử dụng HATU và bazơ thích hợp, ví dụ như DIEA trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (59) được thể hiện ở bước A. Theo cách khác, việc liên hợp amit được tiến hành bằng cách sử dụng 2-clo-4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin và bazơ thích hợp, ví dụ như 4-metylmorpholin trong dung môi, ví dụ như THF. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng có nhiều điều kiện khác nhau để nhờ đó thực hiện việc liên hợp amit. Bước B mô tả việc đóng vòng nội phân tử hợp chất (59) thành hợp chất (60) bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như natri hydrua trong dung môi, ví dụ như DMF.

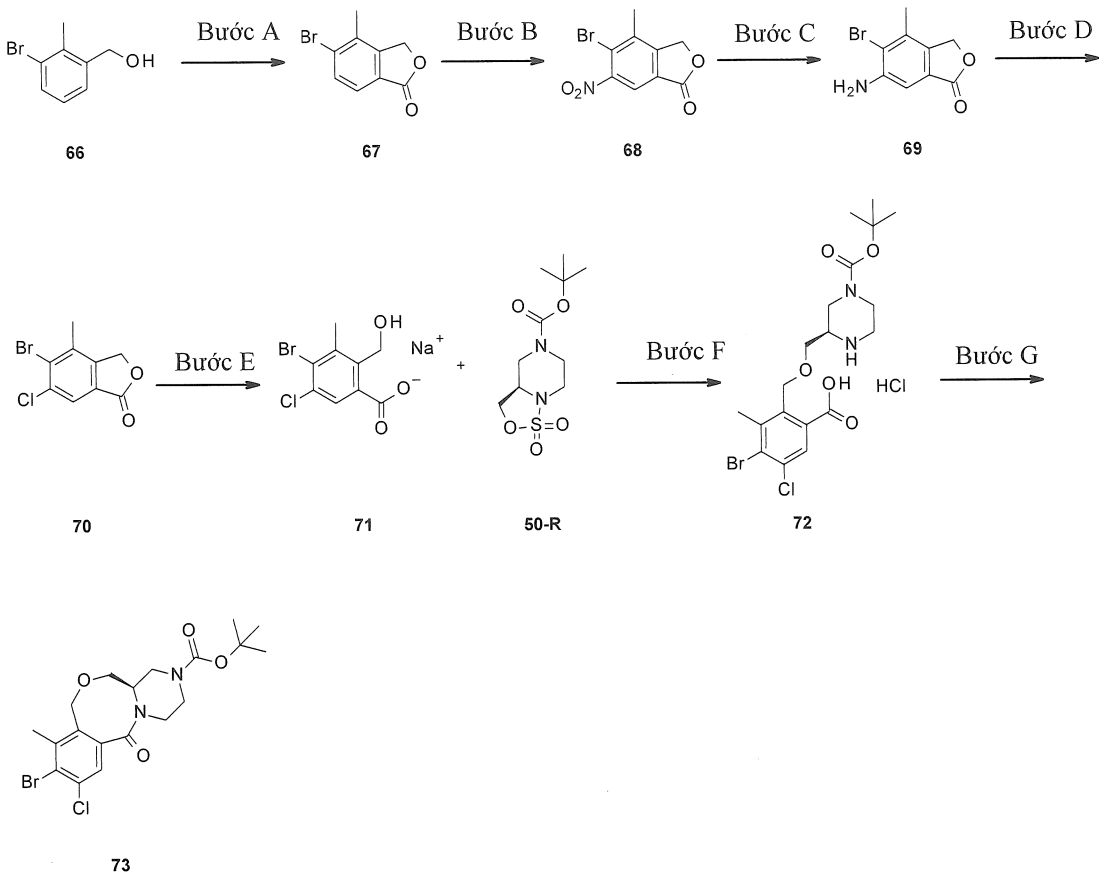
Sơ đồ 14



61 62 63 64 65

Sơ đồ 14, bước A được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước A của Sơ đồ 13 để tạo ra hợp chất (63). Bước B bao gồm việc đóng vòng hợp chất (63) theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước B của Sơ đồ 13 tiếp theo là metyl hóa bằng metyl iodua. Hợp chất (64) và (65) được thu hồi sau bước này.

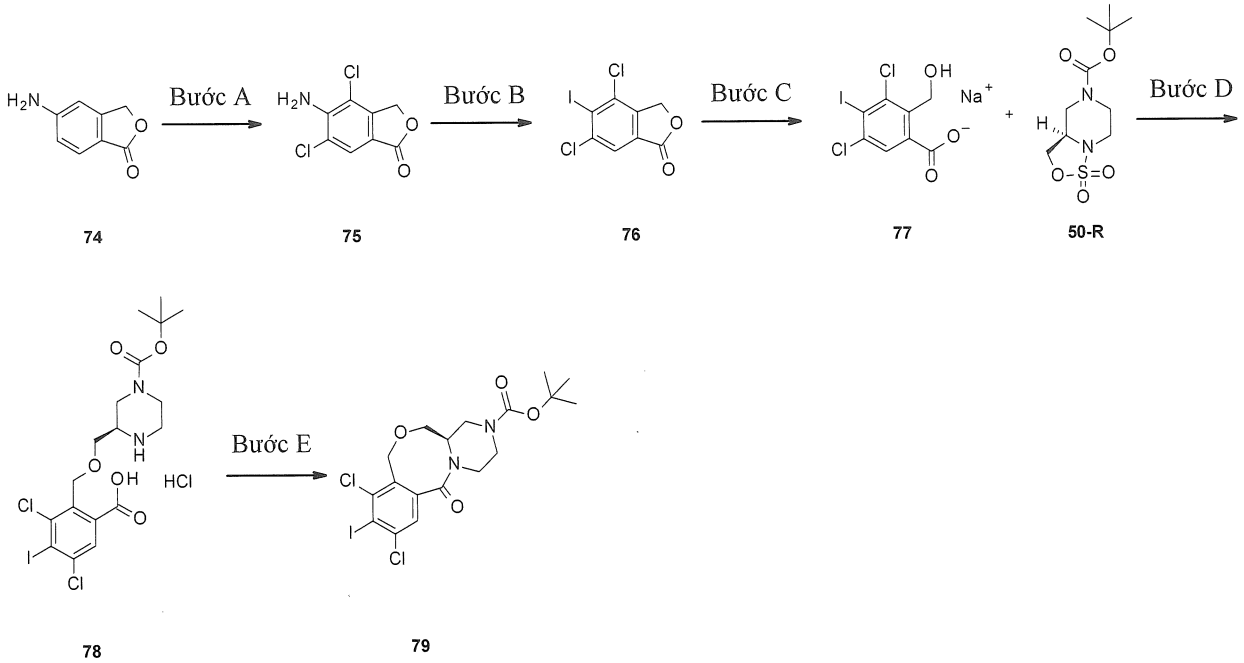
Sơ đồ 15



Sơ đồ 15, bước A, mô tả việc đóng vòng hợp chất (66) bằng cách xử lý bằng thali(III) trifloaxetat trong TFA, tiếp theo là bổ sung magie oxit, lithi clorua, và MeOH bằng xúc tác, ví dụ như paladi(II) clorua trong môi trường cacbon monoxit để tạo ra hợp chất (67). Bước B thể hiện việc nitrat hóa hợp chất (67) bằng cách sử dụng kali nitrat trong dung dịch axit sulfuric đặc để tạo ra hợp chất (68). Việc hydro hóa nhóm nitro trên hợp chất (68) bằng cách sử dụng Pt/C trong hệ dung môi ví dụ như DCM và TFA để tạo ra hợp chất (69) được thể hiện ở bước C. Bước D thể hiện phản ứng Sandmeyer để chuyển hóa nitơ anilin của hợp chất (69) thành clo, các điều kiện người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết, để tạo ra hợp chất (70). Bước E mô tả việc thủy phân hợp chất (70) bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như dung dịch nước NaOH bằng nhiệt để tạo ra hợp chất (71). Việc alkyl hóa hợp chất (71) bằng hợp chất (50-R) bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như NaH trong hệ dung môi, ví dụ như DMF và THF để tạo ra hợp chất (72) được thể hiện ở bước F. Bước G mô tả việc liên hợp amit nội phân tử trong hợp chất (72) bằng cách sử dụng HATU và

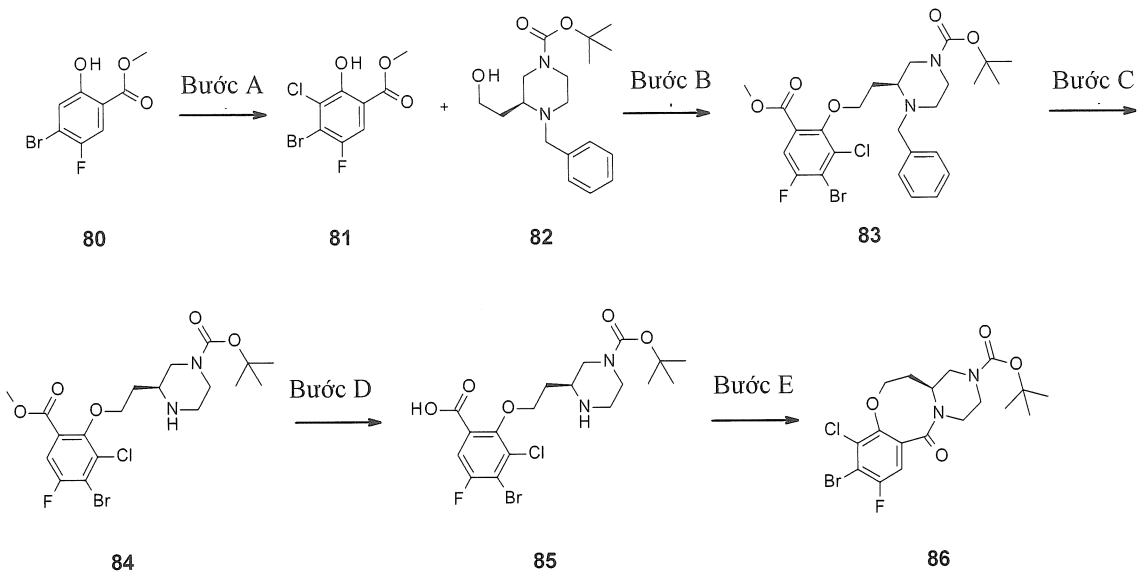
bazơ thích hợp, ví dụ như DIEA trong dung môi, ví dụ như DMF để tạo ra hợp chất (73).

Sơ đồ 16



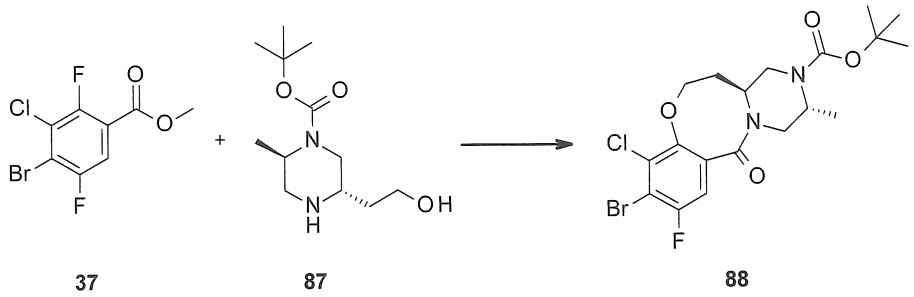
Sơ đồ 16, bước A được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước A của Sơ đồ 6 để tạo ra hợp chất (75). Bước B thể hiện phản ứng Sandmeyer để chuyển hóa nitơ anilin của hợp chất (75) thành iot, điều kiện của nó sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến, để tạo ra hợp chất (76). Bước C-E được tiến hành theo cách gần như tương tự với các phương pháp được nêu ở bước E-G của Sơ đồ 15 để tạo ra các hợp chất (77-79).

Sơ đồ 17



Sơ đồ 17, bước A mô tả việc clo hóa hợp chất (80) bằng chất clo hóa thích hợp ví dụ như NCS trong dung môi thích hợp, ví dụ như axetic axit bằng nhiệt để tạo ra hợp chất (81). Bước B mô tả phản ứng Mitsunobu giữa các hợp chất (81) và (82) bằng cách sử dụng triphenyl phosphin và diisopropyl azodicarboxylat trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (83). Bước C thể hiện việc khử benzyl của hợp chất (83) bằng cách sử dụng diisopropyl amin và 1-cloetyl clofomat trong dung môi thích hợp, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (84). Bước D mô tả việc thủy phân bazơ của este trên hợp chất (84) bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như lithi hydroxit trong hệ dung môi, ví dụ như THF và nước để tạo ra hợp chất (85). Việc liên hợp amit nội phân tử hợp chất (85) bằng cách sử dụng propylphosphonic anhydrit bằng bazơ thích hợp ví dụ như TEA trong dung môi, ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (86) được mô tả ở bước E.

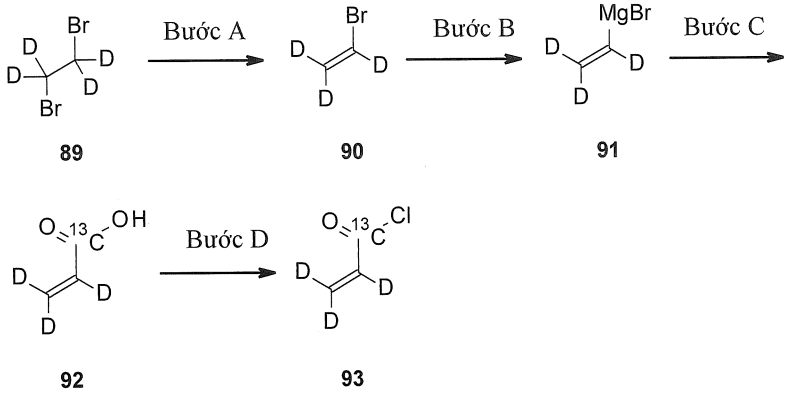
Sơ đồ 18



37 87 88

Sơ đồ 18 thể hiện việc liên hợp hợp chất (37) và hợp chất (87) và tiếp theo đóng vòng để tạo ra hợp chất (88) bằng cách sử dụng bazơ thích hợp, ví dụ như xeri cacbonat trong dung môi, ví dụ như DMF bằng nhiệt.

Sơ đồ 19

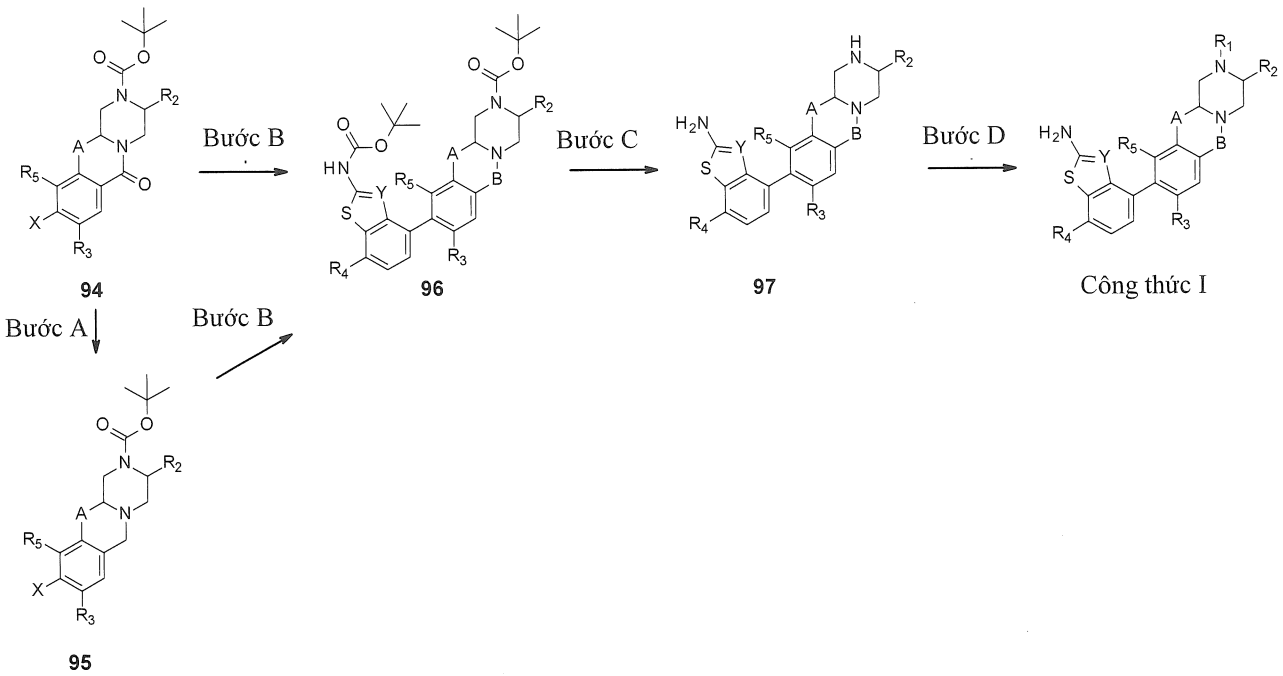


89 90 91

92 93

Sơ đồ 19, bước A thể hiện việc chuyển hóa hợp chất (89) thành hợp chất (90) bằng cách xử lý bằng bazơ thích hợp, ví dụ như KOH trong hệ dung môi, ví dụ như EtOH đơteri hóa trong D_2O. Bước B mô tả phản ứng Grignard của hợp chất (90) với magie trong dung môi, ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (91). Việc carboxyl hóa hợp chất (91) bằng $^{13}CO_2$ trong dung môi ví dụ như THF để tạo ra hợp chất (92) được thể hiện ở bước C. Bước D thể hiện phản ứng của hợp chất (92) với oxalyl clorua trong dung môi, ví dụ như DCM với DMF xúc tác để tạo ra hợp chất (93).

Sơ đồ 20



Trên Sơ đồ 20, hợp chất (94) là nhân ba vòng được mô tả trên các Sơ đồ 13-18. Ở bước A, amit trong hợp chất (94) được khử bằng cách sử dụng chất khử thích hợp, ví dụ như phức boran dimetyl sulfua trong THF để tạo ra hợp chất (95). Hợp chất (94) và hợp chất (95) có thể cùng tham gia liên hợp chéo Suzuki với boronat như được mô tả trên các Sơ đồ 1-5 bằng cách sử dụng xúc tác thích hợp, ví dụ như 1,1'-bis(di-*tert*-butylphosphino)feroxen paladi diclorua với bazơ thích hợp, ví dụ như kali phosphat tribasic trong hệ dung môi, ví dụ như 1,4-dioxan và nước bằng nhiệt để tạo ra hợp chất (96). Theo cách khác, việc liên hợp này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng xúc tác thích hợp, ví dụ như DPEPhosPdCl_2 bằng bazơ ví dụ như xeri cacbonat trong dung môi, ví dụ như toluen bằng nhiệt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng có nhiều chất xúc tác, bazơ, và tổ hợp dung môi có thể được sử dụng để thực hiện loại chuyển hóa này. Bước C thể hiện việc khử nhóm bảo vệ axit hợp chất (96) bằng axit, ví dụ như TFA trong dung môi ví dụ như DCM để tạo ra hợp chất (97). Bước D thể hiện việc liên hợp giữa hợp chất (97) và các đối tác để tạo ra các hợp chất có Công thức I. Các đối tác có thể là axit clorua, axit carboxylic, hoặc xyano bromua. Trong trường hợp với axit clorua, bazơ thích hợp ví dụ như TEA hoặc DIEA được sử dụng trong dung môi, ví dụ như DCM. Axit clorua còn có thể được sử dụng với kali cacbonat dưới dạng bazơ trong hệ dung môi hai pha, ví dụ như EtOAc, THF, và nước.

Trong trường hợp đối tác là axit carboxylic, các điều kiện bao gồm chất phản ứng liên hợp thích hợp, ví dụ như propylphosphonic anhydrit với bazơ thích hợp, ví dụ như DIEA trong dung môi, ví dụ như DMF. Nếu đối tác là xyano bromua, bazơ thích hợp, ví dụ như dung dịch nước NaOH được sử dụng trong dung môi, ví dụ như DCM.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ điều chế và ví dụ

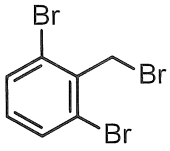
Các Ví dụ điều chế và các ví dụ sau đây minh họa thêm cho sáng chế và thể hiện quá trình tổng hợp điển hình của hợp chất theo sáng chế, nhưng không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kì cách nào. Các chất phản ứng và các nguyên liệu ban đầu dễ dàng có được hoặc có thể được tổng hợp dễ dàng bởi các quy trình đã biết hoặc sử dụng một vài cải biến mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện được.

Các hợp chất có thể được đặc trưng bởi phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phun điện (LC-ES/MS) được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng Agilent HP1100. Các kết quả đo phổ khối phun điện tử (thu được theo chế độ dương và/hoặc âm) được tạo ra trên phổ khối kế bốn cực Mass Selective Detector có giao diện với HP1100 HPLC. Các điều kiện LC-MS (độ pH thấp): cột: PHENOMENEX® GEMINI® NX C-18 2,1 × 50 mm 3,0 µm; gradient: 5-100% B trong 3 phút, sau đó 100% B trong 0,75 phút, nhiệt độ cột: 50 °C +/-10 °C; tốc độ dòng: 1,2 mL/phút; dung môi A: nước khử ion với 0,1% HCOOH; dung môi B: ACN với axit formic 0,1%; bước sóng 214 nm. Các điều kiện LC-MS khác (độ pH cao): Cột: WATERS™ XTERRA® MS cột C-18 2,1 × 50 mm, 3,5 m; gradient: 5% dung môi A trong 0,25 phút, gradien từ 5% đến 100% dung môi B trong 3 phút và 100% dung môi B trong 0,5 phút hoặc 10% đến 100% dung môi B trong 3 phút và ở 100% dung môi B trong 0,75 phút; nhiệt độ cột: 50 °C +/-10 °C; tốc độ dòng: 1,2 mL/phút; dung môi A: 10 mM NH_4HCO_3 pH 9; Dung môi B: ACN; bước sóng: 214 nm.

Sắc ký pha đảo điều chế được thực hiện trên Agilent 1200 LC-ES/MS có lắp máy đo phổ khối bộ dò chọn lọc khối và thiết bị thu gom phân đoạn/thiết bị lấy mẫu tự động Leap. Các phương pháp độ pH cao được vận hành trên cột PHENOMENEX® GEMINI®-NX 75 x 30 mm, cỡ hạt 5 µm có tấm bảo vệ 10 x 20 mm. Tốc độ dòng 85 ml/phút. Dung môi rửa giải là amoni bicacbonat (độ pH 10) 10 mM trong ACN.

Ví dụ điều chế 1

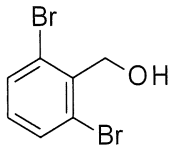
1,3-Dibromo-2-(bromometyl)benzen



NBS (35,0 g, 195 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 2,6-dibromotoluen (50,0 g, 194 mmol) trong cacbon tetraclorua (500 mL). Hỗn hợp này được đun nóng đến 80 °C và AIBN (3,20 g, 19,1 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được hồi lưu trong 16 giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và lọc. Dịch lọc được pha loãng với EtOAc và rửa bằng nước, dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa, và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các pha hữu cơ được làm khô trên magie sulfat, lọc và cô trong chân không. Phần cặn thu được được làm khô trong chân không cao để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (67,5 g, 84%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,58 (2H, d), 7,04 (1H, t), 4,86 (2H, s).

Ví dụ điều chế 2

(2,6-Dibromophenyl)metanol

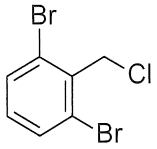


Natri bohydrua (7,83 g, 207 mmol) được bổ sung vào thành ba phần 10 phút một lần vào dung dịch chứa 2,6-dibromobenzaldehyt (148,7 g, 552,3 mmol) đang khuấy ở 0 °C trong EtOH (1,4 L). Sau lần bổ sung cuối cùng, hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút trước khi tôi lần cuối bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (600 mL). DCM (1,75 L) và nước (200 mL) được bổ sung và tách riêng các lớp. Lớp nước được chiết một lần nữa bằng DCM. Góm các lớp hữu cơ, làm khô trên natri sulfat và lọc qua đệm silicoxit, rửa kỹ bằng EtOAc (2 × 500 mL). Dịch lọc được cô *trong chân không*, hấp thụ trong toluen, và cô *trong chân không* lại để tạo ra hợp chất nêu ở đề

mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (148,7 g, 99%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 7,66 (2H, d), 7,17 (1H, t), 5,20 (1H, t), 4,74 (2H, d).

Ví dụ điều chế 3

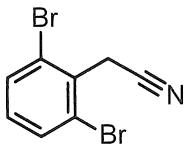
1,3-Dibromo-2-(clometyl)benzen



Dung dịch chứa (2,6-dibromophenyl)metanol (199,3 g, 749,4 mmol) ở 0 °C trong DCM (1,5 L) được xử lý bằng DMF (0,5 mL) được bổ sung vào thionyl clorua (160 mL, 2196 mmol) nhỏ giọt trong 1 giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp này được để cho ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và tiếp theo, đun nóng đến 50 °C qua đêm. Nhiệt được lấy đi và hỗn hợp phản ứng được làm nguội xuống 0 °C trước khi tôi bằng nước (500 mL). Pha loãng hỗn hợp bằng DCM và tách các lớp. Các lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, nước, và một lần nữa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (206,98 g, 95%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 7,75 (2H, d), 7,26 (1H, t), 4,95 (2H, s).

Ví dụ điều chế 4

2-(2,6-Dibromophenyl)axetonitril



Hỗn hợp gồm 1,3-dibromo-2-(bromometyl)benzen (57,0 g, 137 mmol) và kali xyanua (28,0 g, 417 mmol) trong EtOH (350 mL) và nước (90 mL) được hồi lưu trong 5 giờ. Tiếp theo, hỗn hợp được để nguội đến nhiệt độ môi trường và cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc và được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Chiết pha nước bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và

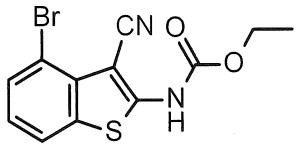
cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel, rửa giải bằng 10-100% DCM/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (34,5 g, 87%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,62 (2H, d), 7,12 (1H, t), 4,14 (2H, s).

Ví dụ điều chế 4 thay thế

Kali xyanua (142,2 g, 2183,5 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 1,3-dibromo-2-(clometyl)benzen (206,98 g, 727,83 mmol) trong DMSO (600 mL) và được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 2 ngày. Sau thời gian này, hỗn hợp này được rót vào hỗn hợp nước đá và được khuấy trong 2 giờ trong đó chất kết tủa màu trắng được tạo thành. Chất kết tủa được lọc và được rửa ba lần bằng nước trước khi sấy khô trong lò chân không. Chất rắn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel rửa giải bằng 10-70% DCM/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (189,23 g, 94%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 7,78 (2H, d), 7,28 (1H, t), 4,22 (2H, s).

Ví dụ điều chế 5

Etyl N-(4-bromo-3-xyano-benzothiophen-2-yl)carbamat



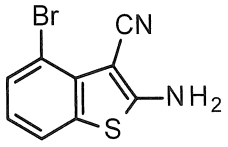
Dung dịch chứa 2-(2,6-dibromophenyl)axetonitril (20,0 g, 71,3 mmol) trong DMF (200 mL) được làm nguội xuống 0 °C. Natri hydrua (60 % khối lượng trong dầu parafin) (2,85 g, 71,3 mmol) được bổ sung vào từng phần. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 10 phút, tiếp theo, etoxycacbonyl isothioxyanat (8,60 mL, 71,4 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào ở nhiệt độ 0-5 °C. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 giờ tiếp theo, đun nóng ở 100 °C trong 4 giờ. Sau thời gian này, dung môi được làm bay hơi *trong chân không*. Phần cặn được khuấy trong hỗn hợp EtOAc và dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Gom chất rắn thu được bằng cách lọc, rửa bằng nước, và sấy khô trong lò chân không ở 60-65 °C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (10,5 g, 45%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 322,8/324,8 $[M-H]^-$.

Ví dụ điều chế 5 thay thế

Natri hydrua (60 % khối lượng trong dầu parafin) (24,85 g, 621,3 mmol) được tạo huyền phù trong DMF (500 mL) và được làm mát xuống 0 °C. Huyền phù lạnh này được bổ sung theo kiểu nhỏ giọt dung dịch chứa 2-(2,6-dibromophenyl)axetonitril (169,14 g, 615,19 mmol) trong DMF (600 mL) trong 1 giờ sao cho nhiệt độ không tăng lên trên 7 °C. Sau 30 phút, etoxycacbonyl isothioxyanat (77,81 mL, 646,0 mmol) được bổ sung vào trong 30 phút trong khi vẫn ở 0 °C. Hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 10 phút trước khi lấy ra khỏi bể đá và khuấy trong 20 phút nữa. Sau thời gian này, L-prolin (14,16 g, 123,0 mmol) và đồng iodua (11,71 g, 61,49 mmol) được bổ sung và hỗn hợp này được đun nóng đến 65 °C trong 4,5 giờ. Hỗn hợp này được xử lý bằng 0,5M dung dịch nước EDTA (4 L) pha loãng với EtOAc (1,6 L) và được khuấy mạnh qua đêm. Sau thời gian này, vữa đục thu được được lọc và chất rắn được gom được rửa bằng nước và EtOAc. Chất rắn được hút khô trong chân không trong 1,5 giờ, tiếp theo, sấy khô trong lò chân không trong 2 giờ nữa để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (187,24 g, 77%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 11,76 (1H, s), 8,01 (1H, d), 7,65 (1H, d), 7,27 (1H, t), 4,90 (2H, q), 1,31 (3H, t).

Ví dụ điều chế 6

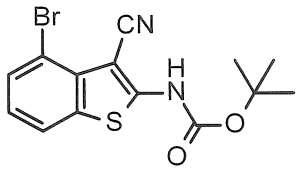
2-Amino-4-bromo-benzothiophen-3-cacbonitril



dung dịch NaOH 5N (765 mL, 3825 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa etyl N-(4-bromo-3-xyano-benzothiophen-2-yl)carbamat (155 g, 476,6 mmol) trong DMSO (480 mL). Hỗn hợp được gia nhiệt đến 125 °C qua đêm. Sau thời gian này, nhiệt được lấy đi và hỗn hợp phản ứng được rót vào hỗn hợp nước đá (4,2 L) và được khuấy mạnh trong 10 phút. Chất kết tủa được tạo thành sẽ được lọc, rửa bằng nước, và sấy khô trong lò chân không trong 2 ngày để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng (73,6 g, 61%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 7,96 (2H, s), 7,70 (1H, d), 7,46 (1H, d), 7,02 (1H, t).

Ví dụ điều chế 7

tert-Butyl N-(4-bromo-3-xyano-benzothiophen-2-yl)carbamat



Dung dịch chứa 2-amino-4-bromo-benzothiophen-3-cacbonitril (20 g, 79,2 mmol), DIEA (21 mL, 120 mmol), và DMAP (800 mg, 6,55 mmol) trong THF (270 mL) và DMF (40 mL) được xử lý bằng di-*tert*-butyldicacbonat (19,6 g, 87,1 mmol). Hỗn hợp này được khuấy trong nitơ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng với nước, dung dịch natri bicacbonat, và EtOAc, tiếp theo, khuấy trong 10 phút. Gom chất rắn thu được bằng cách lọc, rửa bằng EtOAc lạnh, và sấy khô trong lò chân không ở 60 °C qua đêm để thu được hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu be (10,8 g, 38,6%). Dịch lọc được chiết thêm hai lần bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel, rửa giải bằng 20-100% DCM/hexan để thu được hợp chất bổ sung (12,5 g, 45%) tạo ra tổng sản lượng 23,3 g (83%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 351/353 $[M-H]^-$.

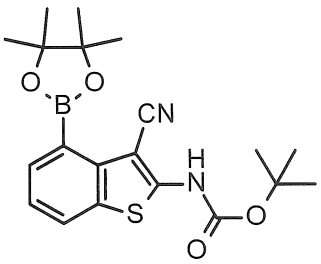
Ví dụ điều chế 7 thay thế

DIEA (77 mL, 441 mmol) và DMAP (2 g, 16 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 2-amino-4-bromo-benzothiophen-3-cacbonitril (74,5 g, 294 mmol) trong THF (2 L), tiếp theo là bổ sung di-*tert*-butyl dicacbonat (73,1 g, 325 mmol). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Sau thời gian này, hỗn hợp này được pha loãng với nước, EtOAc, và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa mà là tiếp theo, lọc để tạo ra chất rắn màu trắng đục. Chất rắn này được rửa bằng nước và EtOAc tiếp theo, sấy khô qua đêm để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này (32 g, 31%). Tiếp theo, tách riêng các lớp dịch lọc và dung dịch nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Gom các lớp hữu cơ, rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô

trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được cho hấp thụ trong DCM (260 mL), siêu âm, pha loãng tiếp với hexan (275 mL), siêu âm, nghiền, và lọc để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này với lượng bổ sung (60,5 g, 58%) và hiệu suất kết hợp 92,5 g (89%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 351/353 $[M-H]^-$.

Ví dụ điều chế 8

tert-Butyl N-[3-xyano-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzothiophen-2-yl]carbamat



Dung dịch chứa *tert*-butyl N-(4-bromo-3-xyano-benzothiophen-2-yl)carbamat (10,90 g, 30,7 mmol), bis(pinacolato)dibo (23,50 g, 92,54 mmol), và kali axetat (9,05 g, 92,2 mmol) trong 1,4-dioxan (150 mL) được vảy nitơ ở 50 °C trong 30 phút. Bình phản ứng được nạp 1,1'-bis(diisopropylphosphino)feroxen (2,25 g, 5,38 mmol) và paladi axetat (0,700 g, 3,12 mmol) và tiếp theo, đun nóng ở 100 °C trong môi trường nitơ. Sau 2 giờ, hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh, pha loãng với EtOAc, lọc qua đất tảo, và được rửa bằng EtOAc. Dịch lọc được xử lý bằng silicagel (150 g), cô đến khô, và tiếp theo, nạp vào ống. Chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel, rửa giải bằng 0-50% DCM/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (9,15 g, 67%). ES/MS m/z: 399,2 (M-H).

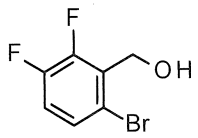
Ví dụ điều chế 8 thay thế

1,4-dioxan (500 mL) được đun nóng đến hồi lưu trong khi vảy nitơ trong 1 giờ. Tiếp theo, giảm nhiệt độ xuống 80 °C trong khi tiếp tục vảy nitơ. Ở nhiệt độ này, *tert*-butyl N-(4-bromo-3-xyano-benzothiophen-2-yl)carbamat (32 g, 90,59 mmol), bis(pinacolato)dibo (60 g, 236 mmol), kali axetat (26,67 g, 271,8 mmol), và cuối cùng, paladi axetat (2,03 g, 9,04 mmol) và bis(2-diphenylphosphinophenyl)ete (8,54 g, 15,9 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được đun nóng ở 100 °C trong ba giờ. Sau thời gian này, nhiệt được lấy đi và hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc, lọc qua đất tảo,

và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được hòa tan trong DCM, xử lý bằng 200 g silic oxit, và cô *trong chân không*. Silic oxit này được cho vào cột chuẩn bị trước, và các chất được tinh chế bằng sắc ký silicagel rửa giải bằng dung dịch 10-95% DCM và 95% DCM/EtOAc được trộn sơ bộ. Các phân đoạn thu được được tách riêng dựa trên độ tinh khiết tương đối. Mỗi bộ được cô riêng biệt *trong chân không*, siêu âm trong heptan, nghiền, lọc, và rửa bằng heptan. Các chất rắn thu được được sấy qua đêm, tiếp theo, gom để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (23,86 g, 65%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 11,32 (1H, s), 8,02 (1H, d), 7,59 (1H, d), 7,34 (1H, t), 1,53 (9H, s), 1,37 (12H, s).

Ví dụ điều chế 9

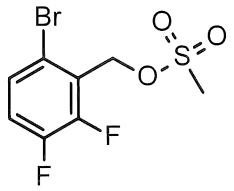
6-Bromo-2,3-diflobenzenmetanol



6-Bromo-2,3-diflobenzaldehyt (20,0 g, 88,7 mmol) được hòa tan trong MeOH (250 mL) và natri bohydrua (6,70 g, 177 mmol) được bổ sung vào từng phần. Sau khi phản ứng tỏa nhiệt được làm mát xuống nhiệt độ môi trường xung quanh (~1 giờ), hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch amoni clorua bão hòa và chiết ba lần bằng DCM. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn được làm khô trong chân không cao qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (19,5 g, 97%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,37 (1H, m), 7,07 (1H, m), 4,88 (2H, m), 2,13 (1H, m).

Ví dụ điều chế 10

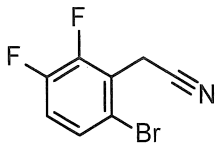
(6-Bromo-2,3-diflophenyl)metyl metansulfonat



6-Bromo-2,3-diflobenzenmetanol (19,5 g, 85,7 mmol) được hòa tan trong THF (200 mL) và DIEA (18,0 mL, 103 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được làm nguội xuống 0 °C và tiếp theo, xử lý bằng metansulfonic anhydrit (17,1 g, 94,2 mmol). Sau khi khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 18 giờ, hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc:metyl *tert*-butyl ete (1:1) và được rửa bằng lạnh nước. Các lớp được tách riêng và dung dịch nước được chiết hai lần bằng EtOAc:metyl *tert*-butyl ete (1:1). Gom các lớp hữu cơ rửa bằng nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat và kali cacbonat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu màu vàng (26,0 g, 99+%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,44 (1H, m), 7,18 (1H, m), 5,43 (2H, d), 3,12 (3H, s).

Ví dụ điều chế 11

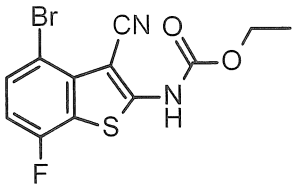
2-(6-Bromo-2,3-diflo-phenyl)axetonitril



Hỗn hợp gồm (6-bromo-2,3-diflophenyl)metyl metansulfonat (26,0 g, 82,0 mmol) và kali xyanua (6,06 g, 90,3 mmol) trong EtOH (200 mL) và nước (40,0 mL) được hồi lưu trong 30 phút và tiếp theo, được làm mát xuống nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung môi được loại bỏ *trong chân không* và cặn được tạo huyền phù trong DCM. Hỗn hợp này được rửa bằng nước, dung dịch natri bicacbonat bão hòa, và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các pha hữu cơ được làm khô trên magie sulfat, lọc và cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 10-100% DCM/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (17,9 g, 94%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,44 (1H, m), 7,15 (1H, m), 3,91 (2H, d).

Ví dụ điều chế 12

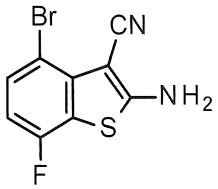
Etyl N-(4-bromo-3-xyano-7-flo-benzothiophen-2-yl)carbamat



Dung dịch chứa 2-(6-bromo-2,3-diflo-phenyl)axetonitril (17,9 g, 77,2 mmol) trong DMF (200 mL) được làm mát trong bể đá và tiếp theo, xử lý bằng kali *tert*-butoxit (9,30 g, 81,2 mmol) từng phần. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút (hỗn hợp phản ứng chuyển sang màu đỏ thẫm) và etoxycacbonyl isothioxyanat (9,80 mL, 81,4 mmol) được bổ sung vào nhỏ giọt. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 giờ, và tiếp theo, đun nóng ở 100 °C trong 30 phút. Tiếp theo, hỗn hợp này được làm mát trong bể đá trong 10 phút và nước (500 mL) được bổ sung vào từ từ trong khi khuấy. Gom chất kết tủa tạo ra bằng cách lọc, rửa bằng nước và hexan, và sấy khô trong không khí. Chất rắn được sấy khô tiếp trong lò chân không ở 60 °C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (24,5 g, 84%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 340,8/342,8 $[M-H]^-$.

Ví dụ điều chế 13

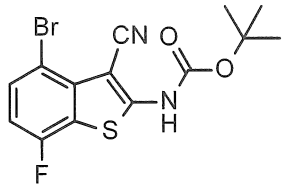
2-Amino-4-bromo-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril



Hỗn hợp gồm etyl N-(4-bromo-3-xyano-7-flo-benzothiophen-2-yl)carbamat (24,5 g, 71,4 mmol), DMSO (100 mL), và dung dịch NaOH 5N (80,0 mL, 400 mmol) được hồi lưu trong 4 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và được xử lý bằng nước lạnh trong khi khuấy mạnh. Gom chất kết tủa tạo ra bằng cách lọc, rửa bằng nước, và sấy khô trong lò chân không ở 65 °C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (15,5 g, 80%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 268,8/270,8 $[M-H]^-$.

Ví dụ điều chế 14

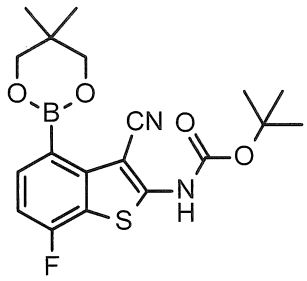
tert-Butyl N-(4-bromo-3-xyano-7-flo-benzothiophen-2-yl)carbamat



Hợp chất nêu ở đề mục này được điều chế từ 2-amino-4-bromo-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril theo cách gần như tương tự với phương pháp của Ví dụ điều chế 7. ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 314,8/316,8 $[M\text{-}t\text{-}Bu+H]^+$.

Ví dụ điều chế 15

tert-Butyl N-[3-xyano-4-(5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)-7-flo-benzothiophen-2-yl]carbamat

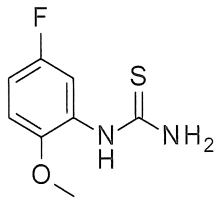


tert-Butyl N-(4-bromo-3-xyano-7-flo-benzothiophen-2-yl)carbamat (16,0 g, 41,4 mmol) và bis(neopentylglycolato)dibo (37,0 g, 157 mmol) được hòa tan trong 1,4-dioxan (300 mL) trong môi trường nitơ. Kali axetat (12,2 g, 124 mmol) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được vảy nitơ trong 1 giờ ở 50 °C. DPEPhosPdCl2 (3,0 g, 4,2 mmol) được bổ sung vào, và bình phản ứng được đun nóng ở 95 °C trong 1 giờ. Tiếp theo, hỗn hợp này được làm mát xuống nhiệt độ môi trường xung quanh, cô *trong chân không* to ~100 mL, pha loãng với heptan (200 mL), được khuấy trong 10 phút, và tiếp theo, lọc qua đất tảo, rửa bằng heptan và heptan:metyl *tert*-butyl ete (1:1). Dịch lọc được cô, được hòa tan trong một lượng tối thiểu DCM, và lọc qua đệm silicagel rửa bằng EtOAc:heptan (1:1). Dịch lọc được rửa bằng dung dịch amoni clorua bão hòa và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các pha hữu cơ được làm khô trên magie sulfat, lọc và cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký

cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 5-50% (20% axeton trong DCM)/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (13,0 g, 78%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 11,6 (1H, s), 7,61 (1H, m), 7,20 (1H, m), 3,78 (4H, s), 1,54 (9H, s), 1,03 (6H, s).

Ví dụ điều chế 16

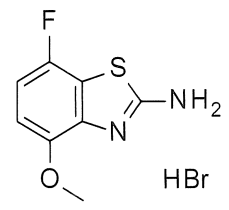
(5-flo-2-metoxy-phenyl)thioure



Benzoyl isothioxyanat (110 g, 671 mmol) và THF (875 mL) được gom và làm mát xuống 5 °C trong môi trường nitơ. 5-flo-2-metoxyanilin (83,2 mL, 705 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng bên trong nhỏ hơn 10 °C. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy trong 30 phút. dung dịch NaOH 5N (161 mL, 805 mmol) và nước (200 mL) được bổ sung và hỗn hợp này được đun nóng ở hồi lưu trong 3,5 giờ. Sau thời gian này, nước (500 mL) và isopropyl axetat (800 mL) được bổ sung và hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch nước HCl đặc được bổ sung vào điều chỉnh độ pH đến ~9-10. Tách riêng các lớp. Lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. EtOAc (360 mL) và hexan (840 mL) được bổ sung vào cặn và hỗn hợp này được hồi lưu trong năm phút. Sau thời gian này, hỗn hợp này được làm nguội xuống -20 °C và để yên qua đêm. Chất rắn thu được được lọc ra và chất rắn gom được được rửa bằng hexan lạnh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (118 g, 88%). ES/MS m/z: 201 (M+H).

Ví dụ điều chế 17

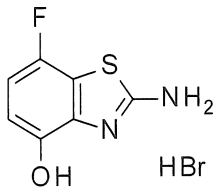
7-flo-4-metoxy-1,3-benzothiazol-2-amin hydro bromua



Dung dịch chứa (5-flo-2-metoxy-phenyl)thioure (118 g, 571 mmol) và $CHCl_3$ (2 L) được làm nguội xuống 5 °C trong môi trường nitơ. Brom (30,1 mL, 582 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng bên trong nhỏ hơn 7 °C. Hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 30 phút trước khi đun nóng ở nhiệt độ hồi lưu trong 2,25 giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp này được làm nguội xuống -20 °C và để yên qua đêm. Các chất rắn thu được được lọc ra và được rửa bằng hexan lạnh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng (141 g, 89%). ES/MS m/z: 199 (M+H).

Ví dụ điều chế 18

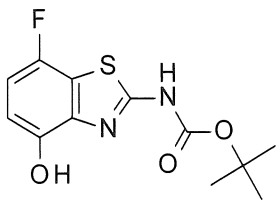
2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-ol hydro bromua



BBr_3 (150 mL, 1589 mmol) được bổ sung qua ống thông vào DCM (1,5 L) ở 0 °C trong môi trường nitơ. 7-flo-4-metoxy-1,3-benzothiazol-2-amin hydro bromua (141 g, 506 mmol) được bổ sung vào từng phần trong 15 phút và hỗn hợp phản ứng này để cho từ từ ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và trong khi khuấy qua đêm. Hỗn hợp này được làm nguội xuống 0 °C và được tôi cẩn thận bằng MeOH trong khi duy trì nhiệt độ bên trong nhỏ hơn 10 °C. Trong khi tôi, khí thoát ra được sục vào dung dịch NaOH 5N lạnh. Chất rắn thu được được lọc và được rửa bằng DCM lạnh để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (117 g, 87%). ES/MS m/z: 185 (M+H).

Ví dụ điều chế 19

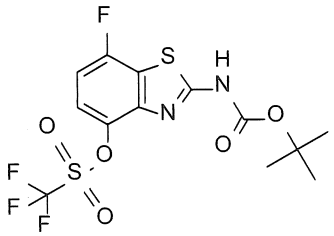
tert-Butyl (7-flo-4-hydroxy-1,3-benzothiazol-2-yl)carbamat



2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-ol hydro bromua (117 g, 441 mmol) trong 1,4-dioxan (1,5 L) được làm nguội xuống 10 °C. TEA (129 mL, 926 mmol) được bổ sung vào trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng bên trong nhỏ hơn 15 °C. DMAP (2,7 g, 22 mmol) và di-*tert*-butyl dicacbonat (228 g, 1014 mmol) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng này là từ từ để ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được khuấy trong hai ngày. Hỗn hợp này được pha loãng với nước, EtOAc, và dung dịch nước natri clorua bão hòa và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ được cô *trong chân không*. MeOH (900 mL) và NaOMe (5M trong MeOH, 132 mL) được bổ sung và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Một lượng NaOMe nữa (5M trong MeOH, 10 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong ba giờ trước khi cô *trong chân không*. Nước và EtOAc được bổ sung và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ là làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không* cho đến khi các chất rắn tạo thành. Hexan được bổ sung và các chất rắn thu được được lọc và rửa bằng hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu nhạt (97,2 g, 78%). ES/MS m/z: 283 (M-H).

Ví dụ điều chế 20

2-[(*tert*-Butoxycacbonyl)amino]-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl triflometansulfonat

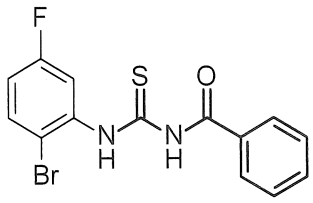


tert-Butyl (7-flo-4-hydroxy-1,3-benzothiazol-2-yl)carbamat (116 g, 407 mmol), DCM (1,4 L), và pyridin (66 mL, 814 mmol) được gom và được làm mát xuống 5 °C trong môi trường nitơ. Triflometansulfonic anhydrit (83 mL, 488 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng bên trong nhỏ hơn 10 °C. Hỗn hợp này được pha loãng với nước và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ được rửa bằng 10% dung dịch nước axit xitric. Lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc

ký pha thông thường, rửa giải bằng 25-28% B trong gradient (A: hexan, B: 25% DCM trong EtOAc), để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng (123 g, 73%). ES/MS m/z: 415 (M-H).

Ví dụ điều chế 21

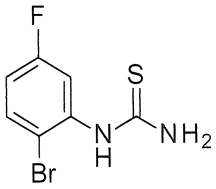
N-[(2-Bromo-5-flo-phenyl)carbamothioyl]benzamit



Dung dịch chứa 2-bromo-5-floanilin (250 g, 1289,4 mmol) trong THF (400 mL) được khuấy bằng thiết bị khuấy cơ phía trên. Benzoyl isothioxyanat (130 g, 780,6 mmol) trong THF (800 mL) được bổ sung vào trong 30 phút bằng cách sử dụng phễu bổ sung. Bể nước được sử dụng để giữ nhiệt độ bên trong nhỏ hơn 30 °C trong quá trình bổ sung. Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng này được rót thành các phần bằng nhau vào ba bình phản ứng 4 lit chứa nước (3 L). Các chất rắn thu được được lọc chân không qua phễu thủy tinh thiêu kết. Các chất rắn được rửa bằng nước khử ion (8 L) và để khô trong không khí trong chân không để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu (456 g, 99+%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 353/355 $[M-H]^-$.

Ví dụ điều chế 22

(2-Bromo-5-flo-phenyl)thioure

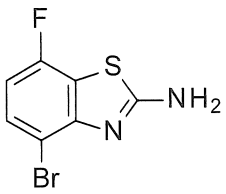


Huyền phù chứa N-[(2-bromo-5-flo-phenyl)carbamothioyl]benzamit (1600 g, 4,53 mol), THF (6 L), và MeOH (1,6 L) được bổ sung vào dung dịch nước dung dịch NaOH 5N (1 L). Sau khi khuấy 18 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm đất tảo để loại bỏ các hạt màu đen. Đệm này được rửa bằng THF/MeOH, tiếp theo, 100% MeOH. Dung môi được loại bỏ *trong chân không*

để thu được chất rắn màu vàng nâu. Nước đá (4 L) được bổ sung vào chất rắn và bằng cách bổ sung thiết bị khuấy phía trên, 5N HCl (~ 300 mL) được bổ sung vào từng phần 100 mL để điều chỉnh độ pH đến 7. Một hỗn hợp nước đá nữa được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy trong ~1 giờ. Nước (4 L) được bổ sung vào và huyền phù này được lọc qua phễu thủy tinh thiêu kết lớn trong chân không. Các chất rắn được rửa bằng nước khử ion và sau khi hầu hết nước được loại bỏ, các chất rắn được rửa bằng hexan (8 L), và sấy khô trong không khí. Các chất rắn được cho vào lò chân không ở 50 °C trong 24 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng đục (1035 g, 92%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 249/251 $[M-H]^-$.

Ví dụ điều chế 23

4-Bromo-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin

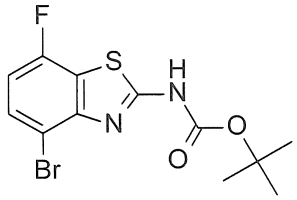


Axit sulfuric (350 mL), được làm mát bằng bể đá/natri clorua, được khuấy bằng thiết bị khuấy cơ phía trên. (2-Bromo-5-flo-phenyl)thioure (130,5 g, 523,9 mmol) được bổ sung vào từng phần trong thời gian 5 phút. Sau 10 phút, nhiệt độ bên trong đạt đến ~1 °C. Trong môi trường nitơ, pyridini tribromua (185 g, 549,53 mmol) được bổ sung thành 8 phần vào trong thời gian ~15 phút trong khi duy trì nhiệt độ bên trong nhỏ hơn 5 °C. Hơi được tạo ra được cho sục qua bẫy NaOH được làm mát trong đá. Sau khi khuấy ở ~0 °C trong 75 phút, hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Tiếp theo, đun nóng hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ bên trong ban đầu là 50 °C, tiếp theo, đun nóng từ từ đến 59 °C. Sau 1,5 giờ, hỗn hợp phản ứng được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào bình phản ứng lớn chứa nước đá. Độ pH được điều chỉnh cẩn thận đến ~7 bằng 18,9N NaOH (620 mL). Các chất rắn được lọc qua phễu thủy tinh thiêu kết và rửa bằng nước khử ion cho đến khi độ pH dịch lọc phù hợp với pH của nước khử ion. Chất rắn được để khô trong không khí tiếp theo, cho vào lò chân không ở ~50 °C trong 24

giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu (129,3 g, 99+%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 247/249 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 24

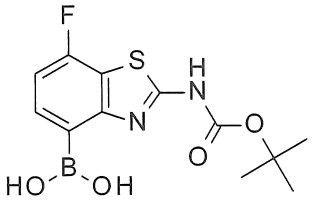
tert-Butyl N-(4-bromo-7-flo-1,3-benzothiazol-2-yl)carbamat



Huyền phù chứa 4-bromo-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin (370,6 g, 1500 mmol) và DMAP (36,6 g, 300 mmol) trong khi khuấy trong DCM (1500 mL) được bổ sung vào từng phần dung dịch chứa di-*tert*-butyl dicacbonat (388 g, 1724 mmol) được hòa tan trong DCM (150 ml) bằng phễu bổ sung với tốc độ sao cho kiểm soát được lượng khí thoát ra. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 giờ và tiếp theo, một phần di-*tert*-butyl dicacbonat nữa (5,0 g, 23 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút và tiếp theo, 10% dung dịch nước axit xitric (800 mL) được bổ sung vào và các lớp được tách riêng. Lớp nước được chiết hai lần bằng DCM và the gom hữu cơ dịch chiết được rửa một lần bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Lớp hữu cơ được cô *trong chân không và* to cặn được bổ sung vào DCM (200 mL) và hexan (1800 mL). Vữa thu được được lọc, sấy khô trong không khí, và chất rắn gom được được bảo quản. Dịch lọc được cô *trong chân không và* to cặn được bổ sung vào MeOH (500 mL) và natri metoxit (20 mL, 5N trong MeOH, 100 mmol). Hỗn hợp này được cô *trong chân không ở* 45 °C. Bổ sung vào cặn MeOH (500 mL) và dung dịch NaOH 5N (100 mL, 500 mmol). Hỗn hợp này được cô *trong chân không ở* 45 °C. Bổ sung vào cặn nước và DCM và các lớp được tách riêng. Lớp nước được chiết một lần bằng DCM. Các lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Bổ sung vào cặn 100 mL DCM và 900 mL hexan, Chất rắn thu được được tạo thành vữa, lọc, sấy khô trong không khí, và kết hợp với chất rắn thu được ban đầu để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng đục (489,55 g, 94%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 290,8/292,8 $[M-t\text{-}Bu+H]^+$.

Ví dụ điều chế 25

Axit [2-(*tert*-Butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]boronic



2-[(*tert*-Butoxycacbonyl)amino]-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl triflometansulfonat (20,0 g, 48,1 mmol), kali axetat (14,2 g, 144 mmol), bis(pinacolato)dibo (97,7 g, 385 mmol), tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) (5,55 g, 4,8 mmol) và 1,4-dioxan (240 mL) được gom và làm sạch bằng nitơ trong mười phút. Hỗn hợp này được đun nóng ở 80 °C qua đêm trước khi làm mát xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và pha loãng với nước và EtOAc. Tách riêng các lớp. Lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Axeton (500 mL), nước (500 mL), và amoni axetat (112 g, 1443 mmol) được bổ sung vào. Tiếp theo, bổ sung $NaIO_4$ (309 g, 1443 mmol), trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng bên trong giữa 18-23 °C. Hỗn hợp này được khuấy mạnh ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Sau thời gian này, EtOAc được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút, lọc qua đất tảo, và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ được cô *trong chân không*. Lớp nước được pha loãng với dung dịch nước natri clorua bão hòa và chiết hai lần bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ được kết hợp với lớp hữu cơ cô đặc ở trên. Gom dịch chiết, rửa bằng nước, dung dịch nước natri clorua bão hòa, nước, và dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn được tạo thành vữa trong hexan bằng lượng nhỏ DCM. Các chất rắn thu được được lọc và rửa bằng hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu (13,4 g, 89%). ES/MS m/z: 313 (M+H).

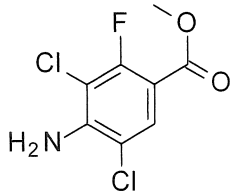
Ví dụ điều chế 25 thay thế

Huyền phù chứa natri hydrua (60% trong dầu parafin) (34,6 g, 865 mmol) trong THF (2000 mL) ở nhiệt độ bên trong -17 °C được bổ sung vào dung dịch chứa *tert*-butyl N-(4-bromo-7-flo-1,3-benzothiazol-2-yl)carbamat (250,18 g, 720,6 mmol) được

hòa tan trong THF (500 mL) trong 15 phút duy trì nhiệt độ bên trong ở -10 °C đến -15 °C trong thời gian bổ sung. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở -10 °C đến -15 °C trong 15 phút, ở thời điểm đó việc thoát khí dừng lại. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội xuống nhiệt độ bên trong là -65 °C và tiếp theo, *n*-butyllithi (350 mL, 2,5M trong hexan, 875 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào bằng phễu bổ sung trong 30 phút ở nhiệt độ để duy trì nhiệt độ bên trong từ -60 °C đến -65 °C. Sau khi bổ sung, hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ này trong 20 phút và tiếp theo, triisopropyl borat (416 ml, 1800 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào trong 15 phút duy trì nhiệt độ bên trong nhỏ hơn -60 °C. Hỗn hợp phản ứng này được để cho từ từ ấm đến nhiệt độ bên trong 0 °C trong 5 giờ 45 phút và tiếp theo, dung dịch nước amoni clorua bão hòa (400 mL) được bổ sung vào cẩn thận để kiểm soát khí thoát ra. Hỗn hợp này được bổ sung nước (400 mL) và EtOAc (400 mL) và các lớp được tách riêng. Lớp nước được bổ sung vào đủ dung dịch nước HCl 1N để tăng độ pH lên 3-4 và tiếp theo, lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Bổ sung vào cặn *n*-heptan (500 mL) và hỗn hợp này được cô *trong chân không ở* 55 °C. Bổ sung vào cặn một phần nữa *n*-heptan (500 mL) và hỗn hợp này được cô *trong chân không ở* 55 °C. Cặn rắn được bổ sung 200 mL DCM và 1800 mL hexan và hỗn hợp này được tạo vữa. Chất rắn được lọc, rửa bằng hexan, và để khô trong không khí để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng đục (217,2 g, 94%). ES/MS m/z: 313 (M+H).

Ví dụ điều chế 26

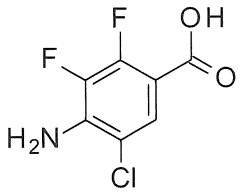
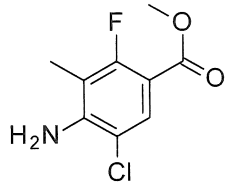
Metyl 4-amino-3,5-diclo-2-flo-benzoat



Metyl 4-amino-2-flo-benzoat (27,0 g, 160 mmol) và NCS (46,3 g, 336 mmol) được hòa tan trong DMF (300 mL) và đun nóng ở 80 °C. Sau 40 phút, hỗn hợp phản ứng này được rót vào hỗn hợp nước đá và chiết hai lần bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa một lần bằng dung dịch NaOH 5N, hai lần bằng 0,2N dung dịch

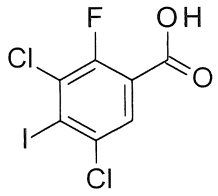
nước LiCl, làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (37,0 g, 97%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 238/240 $[M+H]^+$.

Bảng 1: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 26

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	NMR
27		Axit 4-amino-5-clo-2,3-diflo-benzoic	^1H NMR (DMSO-d6) d 12,96 (s, 1H), 7,54 (dd, J= 2,1, 6,9 Hz, 1H), 6,56 (bs, 2H)
28		Metyl 4-amino-5-clo-2-flo-3-metyl-benzoat	^1H NMR ($CDCl_3$) d 7,80 (d, J= 7,2 Hz, 1H), 4,56 (bs, 2H), 3,16 (s, 3H), 2,14 (d, 3H)

Ví dụ điều chế 29

Axit 3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoic



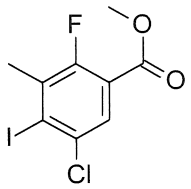
Đồng iodua (10,0 g, 51,5 mmol), ACN (128 mL) và *tert*-butyl nitrit (13,6 mL, 103 mmol) được gom và hỗn hợp này được đun nóng ở 50 °C trong 30 phút và tiếp theo, hỗn hợp này được bổ sung vào metyl 4-amino-3,5-diclo-2-flo-benzoat (6,11 g, 25,7 mmol). Quan sát thấy có khí thoát ra. Sau 1 giờ 40 phút ở 50 °C dung môi được loại bỏ *trong chân không*. Nước, EtOAc, và 1N dung dịch nước HCl được bổ sung vào. Lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước natri bisulfit, làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong*

chân không. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh rửa giải bằng 3-5% EtOAc trong hexan. Các phân đoạn sạch nhất được gom và cô *trong chân không* để tạo ra chất trung gian metyl este (5,85 g, 65%).

Metyl 3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoat (5,85 g, 16,8 mmol) được bổ sung vào MeOH (170 mL) và dung dịch nước NaOH 1N (17 mL). Trong thời gian khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 40 phút, các chất được hòa tan hoàn toàn. MeOH được loại bỏ *trong chân không*. Bổ sung vào cặn EtOAc và dung dịch nước HCl 1N. Lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc và dịch chiết hữu cơ kết hợp được làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (5,56 g, 99%): ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 8,063-8,08 (d, 1H, J= 6,34 Hz).

Ví dụ điều chế 30

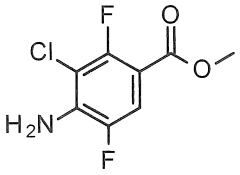
Metyl 5-clo-2-flo-4-iodo-3-metyl-benzoat



Metyl 4-amino-5-clo-2-flo-3-metyl-benzoat (14,8 g, 68,0 mmol) trong ACN (100 mL) được bổ sung vào hỗn hợp đang khuấy chứa đồng iodua (15,7 g, 82,4 mmol), ACN (100 mL) và *tert*-butyl nitrit (12,3 mL, 103 mmol). Hỗn hợp này được đun nóng trong N_2 ở 40 °C trong 18 giờ. Hỗn hợp này được cô *trong chân không* đến một nửa thể tích ban đầu, pha loãng với EtOAc, và lọc hai lần qua đất tảo. Gom các dịch và cô *trong chân không*. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng EtOAc trong hexan. Gom các phân đoạn sạch nhất và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (22,46 g, 52,8%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,91 (d, J= 6,6 Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 2,53 (d, J= 3,1 Hz, 3H).

Ví dụ điều chế 31

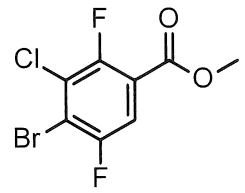
Metyl 4-amino-3-clo-2,5-diflo-benzoat



Dung dịch chứa metyl 4-amino-2,5-diflobenzoat (25 g, 127 mmol) trong DMF (100 mL) được bổ sung vào NCS (19,9 g, 146 mmol) ở nhiệt độ môi trường xung quanh và tiếp theo, hỗn hợp này được đun nóng ở 45 °C trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào hỗn hợp gồm nước (1,5 L) và dietyl ete (1,2 L), và các lớp được tách riêng. Lớp nước được chiết bằng dietyl ete (1 L). Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaOH 1N lạnh, nước, và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các lớp hữu cơ được làm khô trên khan natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 10-30% (75% EtOAc trong DCM)/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (24,5 g, 87%). ES/MS m/z: 222,2 (M+H).

Ví dụ điều chế 32

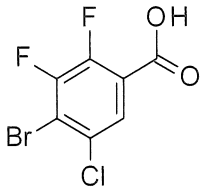
Metyl 4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoat



Metyl 4-amino-3-clo-2,5-diflo-benzoat (24,5 g, 111 mmol) trong ACN (100 mL) được bổ sung vào lạnh hỗn hợp đồng bromua (6,2 g, 28 mmol) và *tert*-butyl nitrit (20 mL, 168 mmol) trong ACN (100 mL). Hỗn hợp màu xanh lá được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh trong 18 giờ. Tiếp theo, pha loãng hỗn hợp phản ứng với ACN, lọc qua đệm đất tảo, và rửa bằng DCM. Dịch lọc được cô và được pha loãng với DCM, lọc lại qua đất tảo, và rửa bằng DCM. Dịch lọc được rửa bằng nước, dung dịch amoni clorua bão hòa (2X), dung dịch nước natri clorua bão hòa (2X), làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 0-50% (10% EtOAc trong DCM)/hexan

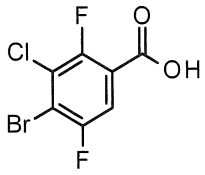
để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (23,5 g, 70%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,68 (1H, m), 3,99 (3H, s).

Bảng 2: Hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 32

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	NMR
33		Axit 4-bromo-5-clo-2,3-diflo-benzoic	^{1}H NMR (DMSO-d6) d 7,89 (dd, J= 2,2, 6,2 Hz, 1H)

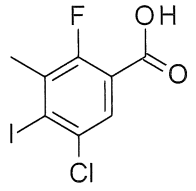
Ví dụ điều chế 34

Axit 4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoic



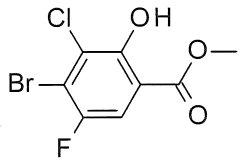
Dung dịch chứa metyl 4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoat (10,8 g, 37,8 mmol) trong THF (100 mL) được bổ sung vào MeOH (50 mL). Dung dịch đồng nhất này được làm mát trong bể đá và NaOH 2N (60 mL, 120 mmol) được bổ sung vào nhỏ giọt. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút. Dung môi hữu cơ được loại bỏ *trong chân không*. Dung dịch nước được làm lạnh bằng đá và pH được điều chỉnh đến ~2,0 băng HCl 5N (24 mL). Dung dịch nước được chiết bằng EtOAc (3X). Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được làm khô trong lò chân không ở 60 °C qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (10,3 g, 99%). ^{1}H NMR (DMSO-d6) d 7,81 (dd, J= 6,0, 8,6 Hz, 1H).

Bảng 3: Hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 34

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	NMR
35		Axit 5-clo-2-flo-4-iodo-3-metyl-benzoic	^{1}H NMR (DMSO-d6) d 13,62 (s, 1H), 7,84 (d, J= 6,7 Hz, 1H), 2,45 (d, 3H).

Ví dụ điều chế 36

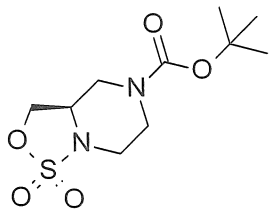
Metyl 4-bromo-3-clo-5-flo-2-hydroxy-benzoat



Dung dịch chứa metyl 4-bromo-5-flo-2-hydroxy-benzoat (9 g, 34,3 mmol) trong axit axetic (70 mL) được bổ sung vào NCS (14 g, 104,8 mmol) và hỗn hợp này được đun nóng đến 55 °C. Sau 18 giờ, một lượng NCS bổ sung (5,5 g, 37,7 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 24 giờ ở 55 °C. Tiếp theo, hỗn hợp phản ứng được làm mát xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và lượng dư axetic axit được loại bỏ *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 100% DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (7,1 g, 73%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 281/283 $[M-H]^-$.

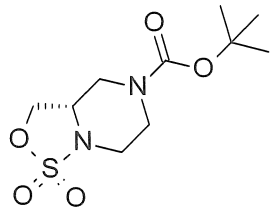
Ví dụ điều chế 37

tert-Butyl (3aR)-1,1-dioxo-3a,4,6,7-tetrahydro-3H-oxathiazolo[3,4-a]pyrazin-5-carboxylat



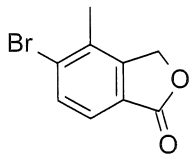
Huyền phù chứa imidazol (24,9 g, 362 mmol) trong DCM (181 mL) ở 0 °C được bổ sung vào thionyl clorua (8,0 mL, 110 mmol) nhỏ giọt. Hỗn hợp được khuấy ở 0 °C trong 5 phút và ở nhiệt độ môi trường trong 1 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội xuống -78 °C và dung dịch chứa *tert*-butyl (3R)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat (8,00 g, 36,2 mmol) trong DCM (181 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào trong 45 phút. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy trong 2,5 ngày. Làm dừng phản ứng bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và pha loãng với nước và DCM. Các lớp được tách riêng và lớp nước được chiết lại bằng DCM. Rửa các lớp hữu cơ thu gom bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra siro màu hổ phách. Dung dịch chứa siro trong axetonitril (282 mL) ở 0 °C được bổ sung vào dung dịch chứa natri periodat (10,2 g, 47,6 mmol) trong nước (92 mL). Rutheni(III) clorua (76 mg, 0,37 mmol) được bổ sung vào. Huyền phù thu được được khuấy ở 0 °C trong 5 phút và ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 5 giờ. Làm dừng phản ứng bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và pha loãng với nước và EtOAc. Các lớp được tách riêng và lớp nước được chiết lại bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, và lọc qua giấy lọc và tiếp theo, qua nút ngắn chứa silicagel. Cô đặc dịch lọc *trong chân không*. Bổ sung vào cặn DCM, và hỗn hợp này được cô *trong chân không và* cho vào chân không qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu (9,39 g, 93%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 4,63 (1H, dd), 4,23 (1H, t), 4,23 (1H, br s), 4,07 (1H, br s), 3,64 (1H, m), 3,45 (1H, d), 3,13 (1H, m), 2,96 (2H, td), 1,47 (9H, s).

Bảng 4: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 37

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	^{1}H NMR ($CDCl_3$)
38		*tert*-Butyl (3aS)-1,1-dioxo-3a,4,6,7-tetrahydro-3H-oxathiazolo[3,4-a]pyrazin-5-carboxylat	4,63 (1H, dd), 4,23 (1H, t), 4,23 (1H, br s), 4,07 (1H, br s), 3,64 (1H, m), 3,45 (1H, d), 3,13 (1H, m), 2,96 (2H, td), 1,47 (9H, s)

Ví dụ điều chế 39

5-Bromo-4-metyl-3H-isobenzofuran-1-on

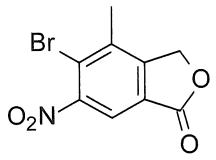


Huyền phù chứa (3-bromo-2-metylphenyl)metanol (15,0 g, 73,1 mmol) trong TFA (75 mL) được bổ sung vào thali(III) trifloaxetat (41,8 g 73,1 mmol). Một lượng TFA nữa (25 mL) được sử dụng để rửa thali(III) trifloaxetat vào bình hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp này được khuấy trong nitơ ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm và cô *trong chân không* và làm khô trong chân không để tạo ra chất rắn màu vàng nâu nhạt. Chất rắn được cho vào trong nitơ và kết hợp với magie oxit (6,01 g, 149 mmol), lithi clorua (6,32 g, 149 mmol), và MeOH (300 mL). Paladi(II) clorua (1,32 g, 7,38 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được làm sạch năm lần bằng cacbon monoxit và cho vào trong môi trường cacbon monoxit (áp suất bình cầu). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 2 giờ và paladi(II) clorua (262 mg, 1,46 mmol) và magie oxit (1,18 g, 29,2 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được làm sạch ba lần bằng cacbon monoxit và cho vào trong môi trường cacbon monoxit (áp suất bình cầu). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút và paladi(II) clorua (262 mg, 1,46 mmol) và magie oxit (1,18 g, 29,2 mmol)

được bổ sung vào. Hỗn hợp này được làm sạch bốn lần bằng cacbon monoxit và cho vào trong môi trường cacbon monoxit (áp suất bình cầu). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1,5 giờ và paladi(II) clorua (327 mg, 1,83 mmol) và magie oxit (1,77 g, 43,9 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được làm sạch bằng cacbon monoxit và cho vào trong môi trường cacbon monoxit (áp suất bình cầu). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1,5 giờ, lọc qua đất tảo, và rửa kỹ đất tảo bằng EtOAc. Dịch lọc được cô *trong chân không* để tạo ra cặn. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 0-30% EtOAc/hexan. Các phân đoạn chứa sản phẩm được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (14,48 g, 70%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 227,0/229,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 40

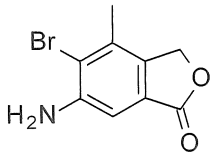
5-Bromo-4-metyl-6-nitro-3H-isobenzofuran-1-on



Dung dịch chứa 5-bromo-4-metyl-3H-isobenzofuran-1-on (14,4 g, 50,7 mmol, độ tinh khiết 80%) trong dung dịch axit sulfuric đặc (160 mL) được làm nguội xuống -5 °C và kali nitrat (9,62 g, 95,2 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy trong nitơ trong 2,5 giờ và đá (750 g) được bổ sung vào trong khi khuấy. Hỗn hợp này được chiết ba lần bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô qua natri sulfat, được lọc, và cô *trong chân không*. Các chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 10-70% EtOAc/hexan. Các phân đoạn chứa sản phẩm được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng đục đến màu vàng/màu cam (11,98 g, 87%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 289,0/291,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 41

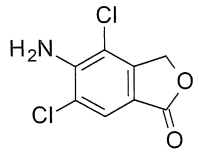
6-Amino-5-bromo-4-metyl-3H-isobenzofuran-1-on



Bình phản ứng chịu áp được bổ sung vào 5-bromo-4-metyl-6-nitro-3H-isobenzofuran-1-on (11,98 g, 44,04 mmol), DCM (1000 mL), TFA (300 mL, 4 mol), và platin (5% trên cacbon, sulfu hóa, 3,00 g, 0,769 mmol). Hỗn hợp này được làm sạch bằng hydro và điều áp đến 45 PSI trong 1,25 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đất tảo và được rửa kỹ bằng DCM. Dịch lọc được cô *trong chân không* để tạo ra cặn. Phần cặn được làm khô trong chân không và tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 10-60% EtOAc/DCM. Các phân đoạn chứa sản phẩm được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu quả đào (9,86 g, 96%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 242,0/244,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 42

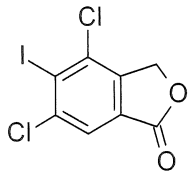
5-Amino-4,6-diclo-3H-isobenzofuran-1-on



Dung dịch chứa 5-amino-3H-isobenzofuran-1-on (10,44 g, 68,60 mmol) trong DMF (100 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh được bổ sung vào NCS (20,56 g, 150,9 mmol). Hỗn hợp này được khuấy ở 50 °C trong 2,5 giờ và ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Hỗn hợp này được rót vào nước (1 L) và chất kết tủa được lọc ra bằng thủy tinh phối liệu, rửa hai lần bằng nước và tiếp theo, bằng dietyl ete, và làm khô bằng cách hút khi qua phối liệu thủy tinh. Chất kết tủa được cho hấp thụ trong EtOAc, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu hơi vàng-màu cam (14,27 g, 93%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 218,2/220,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 43

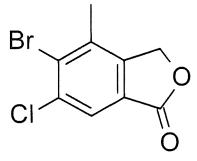
4,6-Diclo-5-iodo-3H-isobenzofuran-1-on



Huyền phù chứa 5-amino-4,6-diclo-3H-isobenzofuran-1-on (8,00 g, 35,6 mmol) trong axetonitril (237 mL) ở -15 °C được bổ sung vào dung dịch axit sulfuric đặc (6,5 mL, 120 mmol) nhỏ giọt. Dung dịch chứa natri nitrit (4,96 g, 71,2 mmol) trong nước (36 mL) được bổ sung vào từ từ. Khuấy hỗn hợp ở 0 °C trong 30 phút. Dung dịch chứa kali iodua (23,6 g, 142 mmol) trong nước (36 mL) được bổ sung vào nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 15 phút và ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút. Hỗn hợp này được pha loãng với dung dịch nước natri sulfit bão hòa và cô từng phần trong chân không để loại bỏ hầu hết axetonitril. Pha loãng hỗn hợp bằng EtOAc và tách các lớp. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Các chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 0-25% EtOAc/hexan. Các phân đoạn chứa sản phẩm không tinh khiết được cô *trong chân không* và tinh chế tiếp bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 100% DCM. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm tinh khiết từ hai lần tinh chế bằng sắc ký, cô *trong chân không*, và cho vào chân không qua đêm để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhợt (6,62 g, 51%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) d 7,89 (1H, s), 5,25 (2H, s).

Ví dụ điều chế 44

5-Bromo-6-clo-4-metyl-3H-isobenzofuran-1-on

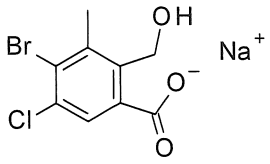


Huyền phù chứa đồng clorua (5,85 g, 43,5 mmol) trong axetonitril (150 mL) trong bể nước lạnh được bổ sung vào *tert*-butyl nitrit (12,9 mL, 108 mmol) trong 5 phút. Hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút và bể nước lạnh được lấy đi. Hỗn hợp này được khuấy trong nitơ trong 25 phút nữa. Dung dịch chứa 6-amino-5-bromo-4-

metyl-3H-isobenzofuran-1-on (8,73 g, 36,1 mmol) trong axetonitril (550 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào và hỗn hợp này được khuấy trong nitơ trong 1,5 giờ. Hỗn hợp này được cô từng phần *trong chân không* để làm giảm thể tích xuống khoảng 275 mL. Hỗn hợp này được pha loãng với dung dịch nước natri clorua bão hòa (300 mL) và 1M HCl (500 mL) và chiết hai lần với EtOAc. Gom các lớp hữu cơ, rửa hai lần với dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa, rửa hai lần với dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Các chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 5-30% EtOAc/DCM. Các phân đoạn chứa sản phẩm được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng pale màu vàng chất rắn (9,03 g, 96%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 278,0/280,0 $[M+H]^+$.

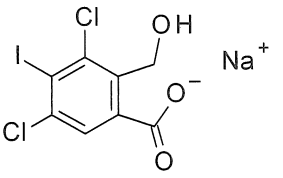
Ví dụ điều chế 45

Natri 4-bromo-5-clo-2-(hydroxymetyl)-3-metyl-benzoat



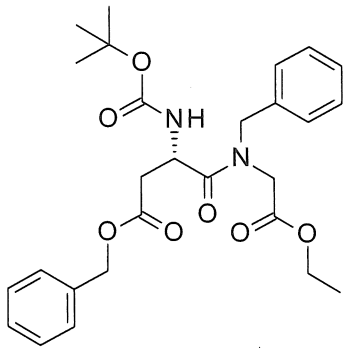
Ống có nắp vặn được lắp thanh khuấy được bổ sung vào 5-bromo-6-clo-4-metyl-3H-isobenzofuran-1-on (2,459 g, 8,557 mmol) và 1M NaOH (9,4 mL, 9,4 mmol). Đậy ống và đun nóng ở 100 °C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và được chuyển vào bình phản ứng 1 L. Toluen (100 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp này được cô *trong chân không và* cho vào chân không trong 3 ngày để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu (2,81 g, 99+%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 276,8/278,8 $[M-H]^-$.

Bảng 5: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 45

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
46		Natri 3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-iodo-benzoat	344,8/346,8

Ví dụ điều chế chuẩn bị 47

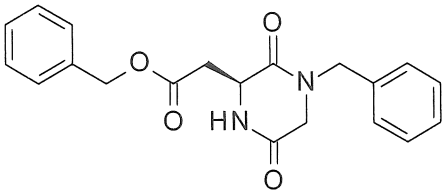
Benzyl (3S)-4-[benzyl-(2-etoxy-2-oxo-etyl)amino]-3-(tert-butoxycacbonylamino)-4-oxo-butanoat



4-benzyl este của axit boc-L-Aspartic (114 g, 352,6 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng. DCM (950 mL) và N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (74,5 g, 361 mmol) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được làm mát xuống 10-20 °C. Benzylglyxin etyl este (68,2 g, 353 mmol) được bổ sung vào nhỏ giọt, giữ nhiệt độ nhỏ hơn 20 °C. Hỗn hợp này được khuấy ở 10-20 °C trong 17 giờ, tiếp theo, lọc và cô *trong chân không*. MTBE (230 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 0,5 giờ. Hỗn hợp này được lọc và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu (174,4 g, 99%).

Ví dụ điều chế 48

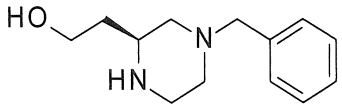
Benzyl 2-[(2S)-4-benzyl-3,6-dioxo-piperazin-2-yl]axetat



Benzyl (3S)-4-[benzyl-(2-etoxy-2-oxo-etyl)amino]-3-(tert-butoxycacbonylamino)-4-oxo-butanoat (174,4 g, 349,8 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng cùng với DCM (500 mL) và TFA (230 mL). Hỗn hợp này được khuấy ở 15-20 °C trong 16 giờ, tiếp theo, cô *trong chân không* đến khô. Phần cặn được hòa tan trong isopropanol (500 mL) và đun nóng đến 80 °C trong 1 giờ. Hỗn hợp này được cô *trong chân không*, tiếp theo, pha loãng với nước (230 mL). Hỗn hợp này được trung hòa bằng 15% NaOH trong nước đến pH 8-9 (109 g dung dịch nước NaOH 15% được sử dụng). Hỗn hợp này được lọc và rửa bằng nước (2 × 100 mL). Các chất rắn được làm khô trong chân không ở 50-55 °C trong 2 ngày để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (95,9 g, 78%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7,44 – 7,29 (m, 8H), 7,32 – 7,23 (m, 2H), 6,91 (br s, 1H), 5,18 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H), 5,14 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 4,64 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 4,54 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 4,44 (br d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 3,88 (d, *J* = 17,7 Hz, 1H), 3,82 (d, *J* = 17,7 Hz, 1H), 3,15 (dd, *J* = 17,5, 3,4 Hz, 1H), 2,93 (dd, *J* = 17,5, 8,3 Hz, 1H).

Ví dụ điều chế 49

2-[(2S)-4-Benzylpiperazin-2-yl]etanol



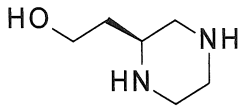
Lithi nhôm hydrua (13 g, 342,5 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng cùng với THF (200 mL). Hỗn hợp này được làm nguội xuống -5-0 °C. Benzyl 2-[(2S)-4-benzyl-3,6-dioxo-piperazin-2-yl]axetat (50 g, 141,9 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng thứ hai cùng với THF (400 mL). Dung dịch chứa benzyl 2-[(2S)-4-benzyl-3,6-dioxo-piperazin-2-yl]axetat được bổ sung từ từ vào dung dịch lithi nhôm hydrua, giữ nhiệt độ giữa -5 và 0 °C. Hỗn hợp phản ứng này được đun nóng đến 60-65 °C và

được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp được làm lạnh đến 20-30 °C và được khuấy trong 16 giờ. nước (13 g) được bổ sung vào, tiếp theo, 4% NaOH trong nước (52 g) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ, lọc, và cô *trong chân không*. Isopropyl axetat (200 mL) và 2M HCl (150 g) được bổ sung vào. Các lớp được tách riêng và lớp nước được rửa lại với isopropyl axetat (100 mL). Lớp nước được điều chỉnh đến pH 11-12 bằng NaOH, và DCM (150 mL) được bổ sung vào. Các lớp được tách riêng và lớp hữu cơ được rửa bằng nước (100 mL). Các lớp được tách riêng và lớp hữu cơ được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (20,1 g, 64%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7,44 – 7,20 (m, 5H), 3,81 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,50 (s, 2H), 3,08 – 2,93 (m, 2H), 2,93 – 2,82 (m, 1H), 2,76 (d, J = 11,5 Hz, 2H), 2,02 (td, J = 11,1, 3,3 Hz, 1H), 1,85 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 1,67 – 1,52 (m, 2H).

Ví dụ điều chế 50

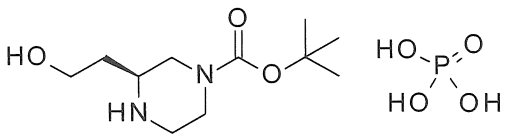
2-[(2S)-Piperazin-2-yl]etanol



2-[(2S)-4-Benzylpiperazin-2-yl]etanol (20 g, 91 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng được xối H_2. MeOH (200 mL) được bổ sung vào và $Pd(OH)_2$ (2 g) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được xối H_2, tiếp theo, điều áp đến 45 psi H_2. Hỗn hợp này được đun nóng đến 50 °C và được khuấy trong 44 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu (12,7 g, 99+%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 3,84 – 3,65 (m, 2H), 3,44 (s, 1H), 2,99 – 2,83 (m, 4H), 2,78 (td, J = 11,6, 2,5 Hz, 1H), 2,68 (td, J = 11,4, 2,8 Hz, 1H), 2,54 – 2,42 (m, 1H), 1,65 – 1,43 (m, 2H).

Ví dụ điều chế 51

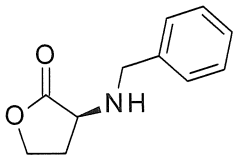
tert-Butyl (3S)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat;axit phosphoric



2-[(2S)-Piperazin-2-yl]etanol (9,2 g, 70,4 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng, cùng với MeOH (83 mL) và nước (9 mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 0,5 giờ ở 15 °C. Di-*tert*-butyl dicacbonat (15,4 g, 70,6 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng thứ hai, cùng với MeOH (92 mL). Dung dịch di-*tert*-butyl dicacbonat được bổ sung vào the 2-[(2S)-piperazin-2-yl]etanol dung dịch trong 0,5 giờ, giữ nhiệt độ nhỏ hơn 15 °C. Hỗn hợp này được khuấy trong 2 giờ ở 15 °C. Axit phosphoric (nồng độ 85%, 8,11 g, 70,4 mmol) và EtOH được gom trong bình phản ứng riêng biệt, và dung dịch axit phosphoric được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này trong 30 phút. Hỗn hợp này được khuấy trong 20 phút ở 15 °C, tiếp theo, làm mát xuống -5 °C trong 3 giờ. Hỗn hợp này được khuấy ở -5 °C trong 1 giờ, lọc và được rửa bằng EtOH, tiếp theo, sấy khô ở 50 °C trong 4 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (5,82 g, 25%). ^{1}H NMR (D_2O) δ 4,11 – 4,03 (m, 1H), 4,00 (br s, 1H), 3,75 – 3,62 (m, 2H), 3,43 – 3,30 (m, 2H), 3,30 – 3,18 (m, 1H), 3,17 – 2,95 (m, 2H), 1,86 – 1,78 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

Ví dụ điều chế 52

(3S)-3-(Benzylamino)tetrahydrofuran-2-on

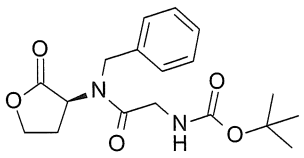


Huyền phù L-homoserin lacton hydroclorua (100 g, 726,93 mmol, bột rây phân tử 4Å (178 g), và benzaldehyt (57 mL, 561,3 mmol) trong DCM (2500 mL) được khuấy qua đêm trong môi trường nitơ ở 35 °C. Sau thời gian này, nhiệt được lấy đi và hỗn hợp này được làm nguội xuống 20 °C. Natri triaxetoxybohydrua (208 g, 981,41 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này mà tiếp theo, nó được để cho ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh sau 20 phút và khuấy trong 2 giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp này được làm nguội xuống -10 °C và được tôi cẩn thận với dung dịch nước natri

bicacbonat bão hòa (400 mL). Độ pH được điều chỉnh đến 8 bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và chất rắn natri bicacbonat. Hỗn hợp này được lọc qua đệm đất tảo và rửa kỹ bằng DCM. Các lớp được tách riêng và dung dịch nước được chiết một lần nữa bằng DCM (1 L). Gom các lớp hữu cơ làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu trong suốt (87 g, 66,5%, 81 % khối lượng). ES/MS m/z: 192,2 (M+H). Để phân tích tiếp, mẫu hợp chất được nêu ở đề mục này (1 g) được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 10-50% EtOAc/DCM để tạo ra 422 mg hợp chất được nêu ở đề mục này đã tinh chế. Chất này được phân tích bằng cách sử dụng Chiralpak® IC, 4,6 x 150 mm, 10% IPA (0,2% IPAm)/CO_2, 5 mL/phút, 225 nm cho thấy >98% lượng dư chất đồng phân đối ảnh

Ví dụ điều chế 53

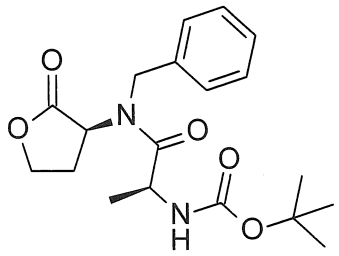
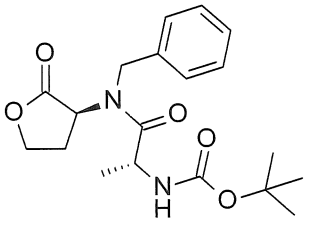
tert-Butyl N-[2-[benzyl-[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-yl]amino]-2-oxo-etyl]carbamat



Hỗn hợp gồm (3S)-3-(benzylamino)tetrahydrofuran-2-on (86 g, 364,27 mmol, 81 % khối lượng), boc-Gly-OH (97 g, 553,71 mmol), và TEA (103 mL, 739 mmol) trong DCM (700 mL) được làm nguội xuống ~5 °C. Propylphosphonic anhydrit (50 % khối lượng trong EtOAc) (430 mL, 737 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào trong một giờ vào hỗn hợp này trong khi giữ nhiệt độ bên trong ~10 °C. Sau khi bổ sung xong, hỗn hợp này được để cho ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau bảy giờ, hỗn hợp này được làm nguội xuống 10 °C và một lượng boc-Gly-OH nữa (3,1 g, 18 mmol), TEA (5 mL, 35,9 mmol), và propylphosphonic anhydrit (50 % khối lượng trong EtOAc) (22 mL, 37,7 mmol) được bổ sung vào. Làm ấm hỗn hợp đến nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy qua đêm. Sau thời gian này, hỗn hợp này được làm nguội xuống 8 °C và một lượng boc-Gly-OH nữa (9,6 g, 55 mmol), TEA (10 mL, 71,7 mmol), và propylphosphonic anhydrit (50 % khối lượng trong EtOAc) (42 mL, 71,9

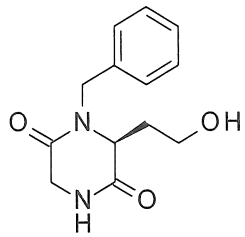
mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được khuấy trong ~7 giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp này được rót vào đá và tôi cẩn thận bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (1 L). Độ pH được điều chỉnh đến 8 bằng natri bicacbonat rắn và các lớp được tách riêng. Dung dịch nước được chiết hai lần nữa bằng DCM. Gom các lớp hữu cơ rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa (500 mL). Lớp hữu cơ được lọc qua đệm đất tảo và natri sulfat. Các lớp hữu cơ được cô *trong chân không* đến thể tích 1 L và được rửa hai lần bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các lớp hữu cơ được làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này để sử dụng mà không cần tinh chế thêm (194 g, 53,5%, 35 % khối lượng). ES/MS m/z: 249,0 (M-t-Bu+H)

Bảng 6: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 53

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
54		*tert*-Butyl N-[(1S)-2-[benzyl-[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-yl]amino]-1-metyl-2-oxo-etyl]carbamat	263,0
55		*tert*-Butyl N-[(1R)-2-[benzyl-[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-yl]amino]-1-metyl-2-oxo-etyl]carbamat	263,0

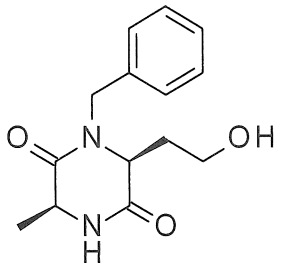
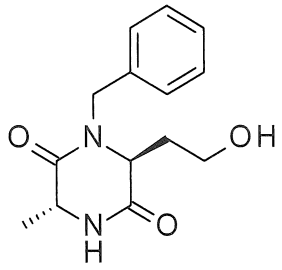
Ví dụ điều chế chuẩn bị 56

(6S)-1-Benzyl-6-(2-hydroxyetyl)piperazin-2,5-dion



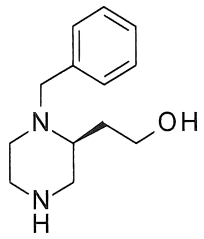
TFA (100 mL, 1310 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp gồm *tert*-butyl N-[2-[benzyl-[(3S)-2-oxotetrahydrofuran-3-yl]amino]-2-oxo-etyl]carbamat (194 g, 194,9 mmol, 35 % khối lượng) trong DCM (500 mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Sau thời gian này, một lượng TFA nữa (50 mL, 653 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau hai giờ, một lượng TFA nữa (50 mL, 653 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Sau thời gian này, hỗn hợp này được cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được pha loãng với nước (600 mL) và được rửa hai lần bằng dietyl ete. Độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng dung dịch nước NaOH 1N và được điều chỉnh tiếp đến pH=12 bằng dung dịch nước NaOH 5N. MeOH (~10 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Một lượng dung dịch nước NaOH 5N nữa được bổ sung vào hỗn hợp này năm phút một lần để điều chỉnh lại độ pH đến 12. Nói chung, hỗn hợp này được khuấy ở pH 12 for 35 phút. Sau thời gian này, độ pH được điều chỉnh đến 8 bằng dung dịch nước HCl 10% và chiết bằng DCM (5 × 1 L). Tiếp theo, điều chỉnh độ pH dung dịch nước đến 5 bằng dung dịch nước HCl 10% và chiết lại bằng DCM (1 L). Gom các lớp hữu cơ, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu nhạt (17 g, 33,4%). Tiến hành chiết tiếp dung dịch nước bằng cách xen kẽ 25% IPA/clorofom và DCM cho đến khi sản phẩm nêu ở đề mục này được loại bỏ khỏi dung dịch nước theo LC/MS. Các lớp hữu cơ gom được được bổ sung IPA (150 mL). Các lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa hai lần, làm khô trên natri sulfat và magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra một lượng hợp chất được nêu ở đề mục này nữa (17,2 g, 35,5%) với tổng hiệu suất 34,2 g (68,9%). ES/MS m/z: 249,0 (M+H)

Bảng 7: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 56

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
57		(3S,6S)-1-benzyl-6-(2-hydroxyetyl)-3-metyl-piperazin-2,5-dion	263,0
58		(3R,6S)-1-benzyl-6-(2-hydroxyetyl)-3-metyl-piperazin-2,5-dion	263,0

Ví dụ điều chế chuẩn bị 59

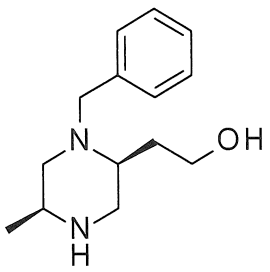
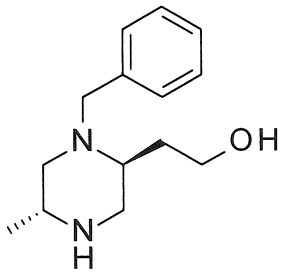
2-[(2S)-1-Benzylpiperazin-2-yl]etanol



Dung dịch chứa 2M lithi nhôm hydrua ở 45 °C trong THF (131 mL, 262 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa (6S)-1-benzyl-6-(2-hydroxyetyl)piperazin-2,5-dion (34 g, 131,5 mmol) trong THF (200 mL) theo kiểu nhỏ giọt. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được đun nóng đến 60 °C. Sau ~3,5 giờ, một lượng lithi nhôm hydrua 2M nữa trong THF (33 mL, 66 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 60 °C. Sau một giờ, một lượng lithi nhôm hydrua 2M nữa trong THF (131 mL, 262 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 60 °C qua đêm. Sau thời gian này, lithi nhôm hydrua 2M trong THF (6 mL, 12 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 60 °C. Sau bốn giờ, lithi nhôm hydrua 2M trong THF (6 mL, 12 mmol)

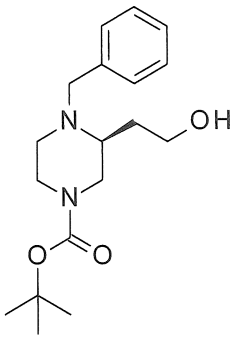
được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong hai giờ ở 60 °C. Nhiệt được lấy đi và hỗn hợp này được làm nguội xuống 10 °C. Nước (16 mL) được bổ sung vào nhỏ giọt, tiếp theo là bổ sung nhỏ giọt 3,75M dung dịch nước NaOH (16 mL) tiếp theo, THF (300 mL). Nước (48 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau thời gian này, hỗn hợp này được lọc qua đệm đất tảo và rửa kỹ bằng EtOAc. Dịch lọc được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (28,8 g, 67,6%, 68 % khối lượng). ES/MS m/z: 221,0 (M+H)

Bảng 8: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 59

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
60		2-[(2S,5S)-1-Benzyl-5-metyl-piperazin-2-yl]etanol	235,0
61		2-[(2S,5R)-1-Benzyl-5-metyl-piperazin-2-yl]etanol	235,0

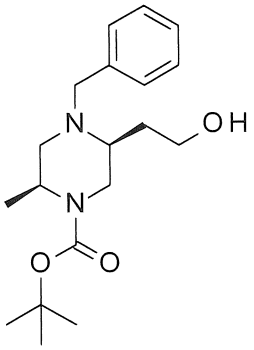
Ví dụ điều chế chuẩn bị 62

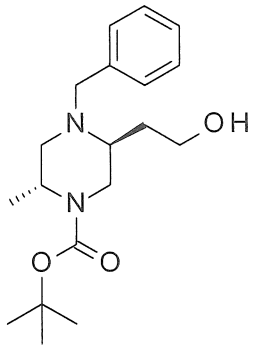
tert-Butyl (3S)-4-benzyl-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat



Natri bicacbonat (80 g, 952 mmol) trong nước (500 mL) được bổ sung vào 2-[(2S)-1-benzylpiperazin-2-yl]etanol (28 g, 86,43 mmol) trong 1,4-dioxan (500 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Di-*tert*-butyl dicacbonat (26,6 g, 122 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 20 phút. Sau thời gian này, đá (400 mL), nước (200 mL), và EtOAc (1 L) được bổ sung và các lớp được tách riêng. dung dịch nước được chiết một lần nữa with EtOAc (1 L). Gom các lớp hữu cơ rửa bằng nước (250 mL) và dung dịch nước natri clorua bão hòa (250 mL), làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Dầu thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 10-70% EtOAc/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (20,79 g, 74%). ES/MS m/z: 321,2 (M+H) Chất này được phân tích bằng cách sử dụng Chiralpak® IC, 4,6 x 150 mm, 15% IPA (0,2% IPAm)/CO_2, 5 mL/phút, 225 nm cho thấy 96% lượng dư chất đồng phân đối ảnh

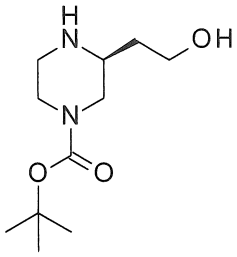
Bảng 9: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 62

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
63		*tert*-Butyl (2S,5S)-4-benzyl-5-(2-hydroxyetyl)-2-metyl-piperazin-1-carboxylat	335,0

64		*tert*-Butyl (2R,5S)-4-benzyl-5-(2-hydroxyetyl)-2-metyl-piperazin-1-carboxylat	335,0

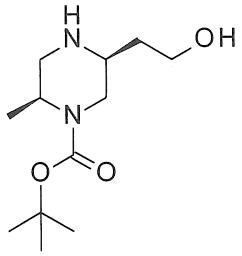
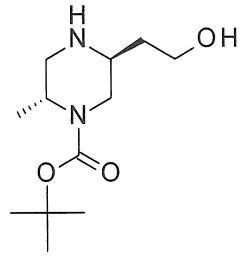
Ví dụ điều chế chuẩn bị 65

tert-Butyl (3S)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat



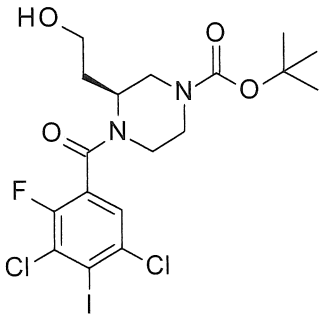
20% $Pd(OH)_2$ on cacbon (24,39 g, 176,4 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng đã được làm sạch bằng nitơ. EtOH (620 mL) được bổ sung vào bình phản ứng này, tiếp theo là *tert*-butyl (3S)-4-benzyl-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat (61,93 g, 193,3 mmol) và EtOH (620 mL). Bình phản ứng này được bịt kín, làm sạch bằng nitơ, làm sạch bằng hydro, và điều áp trong hydro (60 psi). Bình phản ứng này được cho vào bình lắc Parr trong 15 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau thời gian này, hỗn hợp phản ứng này được lọc và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (42,74 g, 98%). ES/MS m/z 231,0: (M+H).

Bảng 10: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 65

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
66		*tert*-Butyl (2S,5S)-5-(2-hydroxyetyl)-2-metyl-piperazin-1-carboxylat	245,0
67		*tert*-Butyl (2R,5S)-5-(2-hydroxyetyl)-2-metyl-piperazin-1-carboxylat	245,0

Ví dụ điều chế chuẩn bị 68

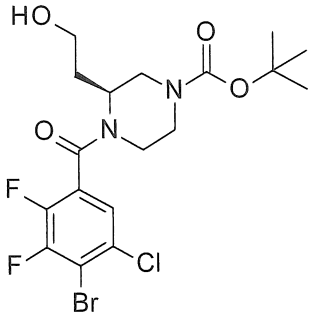
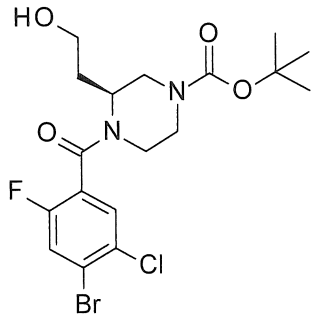
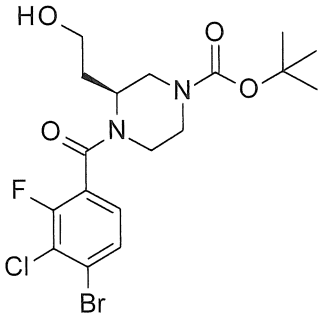
tert-Butyl (3S)-4-(3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat

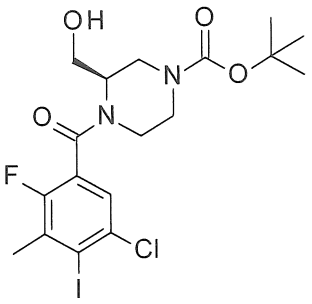
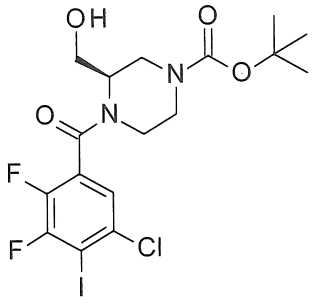
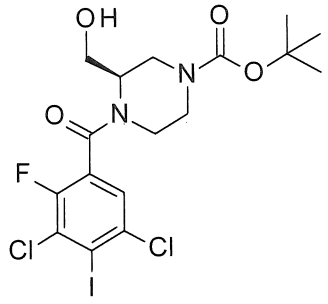
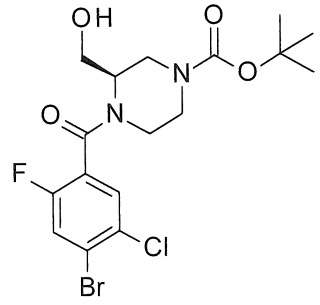
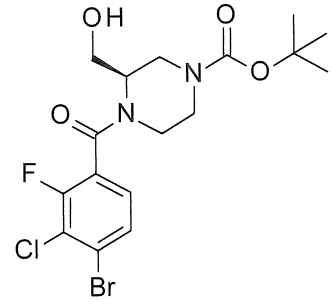


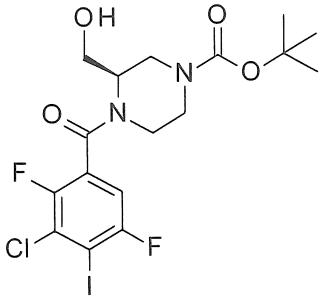
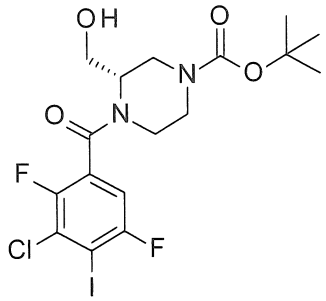
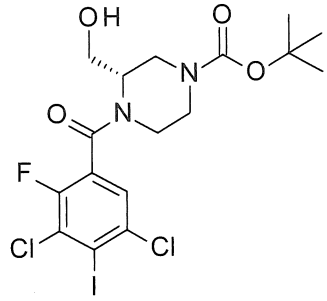
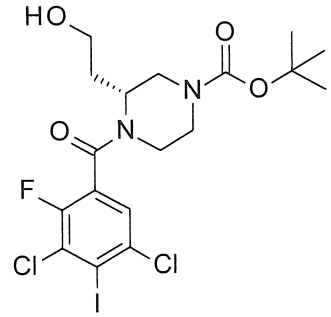
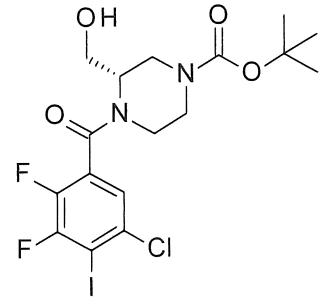
Axit 3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoic (0,80 g, 2,4 mmol) được bổ sung vào DIEA (2 mL, 11,5 mmol) trong THF (22 mL), tiếp theo là HATU (0,84 g, 2,2 mmol) và khuấy trong 1 giờ. Tiếp theo, bổ sung *tert*-Butyl (3S)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat (0,50 g, 2,2 mmol) và hỗn hợp phản ứng này được hồi lưu qua đêm. Sau thời gian này, dung dịch NaOH 5N được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ. EtOAc và nước được bổ sung vào. Lớp nước được chiết hai lần bằng

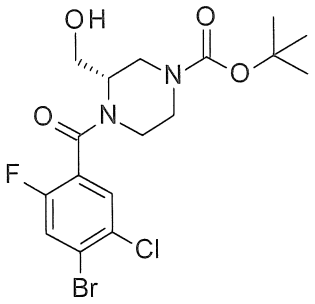
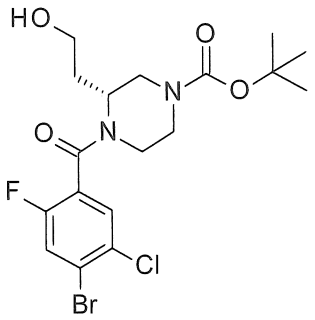
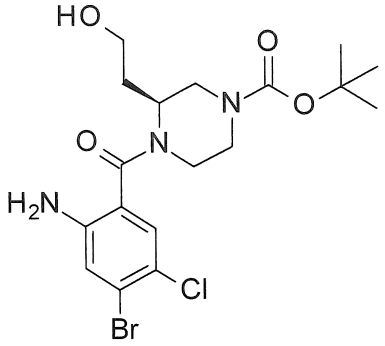
EtOAc. Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng EtOAc: hexan (30:70) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (0,858 g, 72%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 491/493 $[M\text{-}t\text{-}Bu+H]^+$.

Bảng 11: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 68.

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
69		*tert*-Butyl (3S)-4-(4-bromo-5-clo-2,3-diflo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat	427,0/429,0
70		*tert*-Butyl (3S)-4-(4-bromo-5-clo-2-flo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat	408,8/410,8
71		*tert*-Butyl (3S)-4-(4-bromo-3-clo-2-flo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat	408,9/411,0

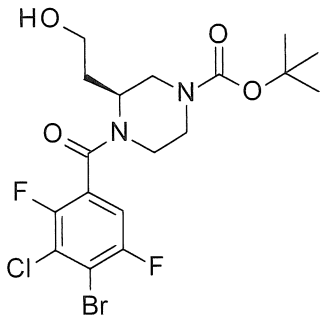
72		*tert*-Butyl (3R)-4-(5-3hloro-2-flo-4-iodo-5-metyl-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	457,0/459,2
73		*tert*-Butyl (3R)-4-(5-clo-2,3-diflo-4-iodo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	461,0/463,0
74		*tert*-Butyl (3R)-4-(3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	476,8/478,8
75		*tert*-Butyl (3R)-4-(4-bromo-5-clo-2-flo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	394,8/396,8
76		*tert*-Butyl (3R)-4-(4-bromo-3-clo-2-flo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	394,8/396,8

77		*tert*-Butyl (3R)-4-(3-clo-2,5-diflo-4-iodo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	461,0/463,0
78		*tert*-Butyl (3S)-4-(3-clo-2,5-diflo-4-iodo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	461,2/463,0
79		*tert*-butyl (3S)-4-(3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	477,0/478,9
80		*tert*-butyl (3R)-4-(3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat	490,9/492,8
81		*tert*-butyl (3S)-4-(5-clo-2,3-diflo-4-iodo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	461,0/463,0

82		*tert*-butyl (3S)-4-(4-bromo-5-clo-2-flo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl)piperazin-1-carboxylat	394,8/396,8
83		*tert*-butyl (3R)-4-(4-bromo-5-clo-2-flo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat	408,8/410,8
84		*tert*-Butyl (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-clo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat	406,0/408,0

Ví dụ điều chế chuẩn bị 85

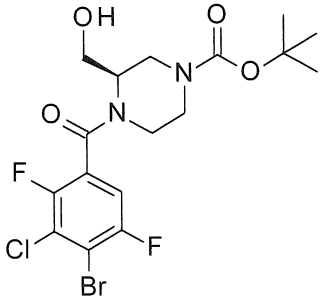
tert-Butyl (3S)-4-(4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat



Dung dịch chứa axit 4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoic (10,2 g, 37,6 mmol) và 4-metylmorpholin (7,50 mL, 68,0 mmol) trong THF (200 mL) được làm nguội xuống 0 °C trong bể đá và được xử lý bằng 2-clo-4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin (9,10 g, 50,8

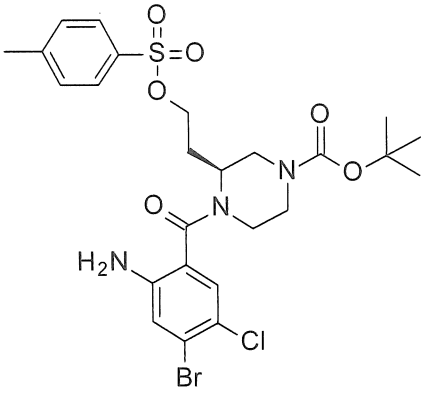
mmol). Hỗn hợp này được khuấy trong bể đá trong 30 phút, và tiếp theo, *tert*-butyl (3S)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat (0,93M trong THF, 40,0 mL, 37,2 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào qua phễu nhỏ giọt. Sau 1 giờ ở 0 °C, dung dịch NaOH 5N (35,0 mL, 180 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút. Hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc, xử lý bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa, và được khuấy trong 15 phút. Pha hữu cơ được tách riêng, rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 0-90% (20% axeton trong DCM)/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (16,0 g, 88%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 427/429 [M-t-Bu+H]$^{+}$.

Bảng 12: Hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 85

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
86		*tert*-Butyl (3R)-4-(4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoyl)-3-(hydroxymetyl) piperazin-1-carboxylat	412,8/414,8

Ví dụ điều chế chuẩn bị 87

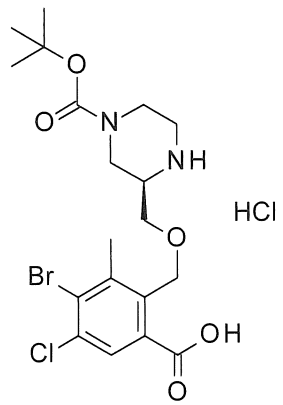
tert-Butyl (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-clo-benzoyl)-3-[2-(p-tolylsulfonyloxy)etyl]piperazin-1-carboxylat



Dung dịch chứa *tert*-butyl (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-clo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat (1 g, 2,16 mmol) và TEA (1 mL, 7,14 mmol) trong DCM (25 mL) ở 0 °C được bổ sung DMAP (45 mg, 0,36 mmol) và p-toluensulfonyl clorua (469 mg, 2,39 mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0 °C trong 15 phút trước khi để ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Một lượng p-toluensulfonyl clorua nữa (122 mg, 0,62 mmol) được bổ sung vào sau 3 giờ. Sau 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được pha loãng với DCM và được rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Các lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (473 mg, 35%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 616,0/618,0 $[M+H]^+$

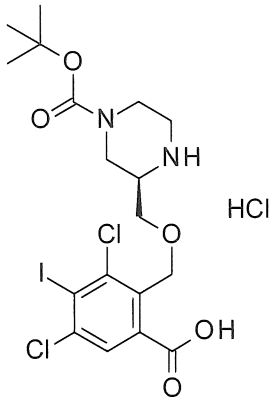
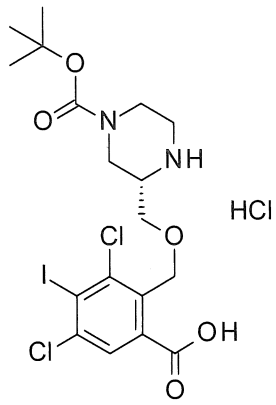
Ví dụ điều chế 88

Hydroclorua của axit 4-Bromo-2-[[(2R)-4-*tert*-butoxycacbonylpiperazin-2-yl]metoxymetyl]-5-clo-3-metyl-benzoic



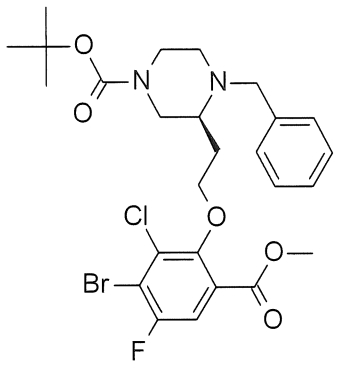
Natri 4-bromo-5-clo-2-(hydroxymetyl)-3-metyl-benzoat (2,05 g, 6,39 mmol) trong bình phản ứng 250 mL được bổ sung toluen (50 mL) và hỗn hợp này được cô *trong chân không.* Phần cặn được hòa tan trong DMF (21 mL) và THF (11 mL) và được làm mát xuống 0 °C. Natri hydrua (60 % khối lượng trong dầu parafin) (511 mg, 12,8 mmol) được bổ sung vào. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 10 phút. *tert*-butyl (3aR)-1,1-dioxo-3a,4,6,7-tetrahydro-3H-oxathiazolo[3,4-a]pyrazin-5-carboxylat (1,96 g, 7,04 mmol) trong bình phản ứng thứ hai được bổ sung toluen (20 mL) và hỗn hợp này được cô *trong chân không.* Phần cặn được hòa tan trong THF (11 mL) và được bổ sung nhỏ giọt vào các chất của bình phản ứng thứ nhất ở 0 °C. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy trong 1,5 giờ. Dung dịch HCl 5M (7 mL) được bổ sung từ từ và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 5 phút và tiếp theo, được tôi bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Độ pH được giảm xuống pH 2 bằng cách bổ sung từ từ dung dịch HCl 5M, và hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc. Các lớp được tách riêng và lớp nước được chiết ba lần bằng EtOAc. Làm khô các lớp hữu cơ thu gom được trên natri sulfat, lọc, và cô đặc *trong chân không*. Phần cặn được hòa tan trong THF (40 mL) và dung dịch HCl 5M (6 mL) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 20 phút. Hỗn hợp được pha loãng với dung dịch nước natri clorua bão hòa và EtOAc và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*, và cho vào chân không trong 2 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nâu (4,27 g, 73%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 477,2/479,2 $[M+H]^+$.

Bảng 13: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 88

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
89		Hydroclorua của axit 2-[[(2R)-4-*tert*-Butoxycacbonylpiperazin-2-yl]metoxymetyl]-3,5-diclo-4-iodo-benzoic	545,2/547,2
90		Hydroclorua của axit 2-[[(2S)-4-*tert*-Butoxycacbonylpiperazin-2-yl]metoxymetyl]-3,5-diclo-4-iodo-benzoic	545,0/547,2

Ví dụ điều chế chuẩn bị 91

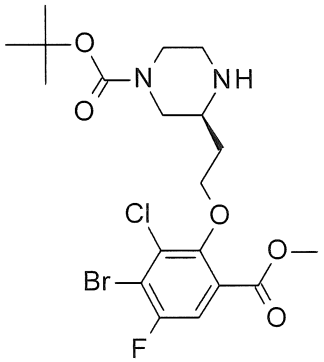
tert-Butyl (3S)-4-benzyl-3-[2-(3-bromo-2-clo-4-flo-6-metoxycacbonyl-phenoxy)etyl]piperazin-1-carboxylat



Dung dịch chứa metyl 4-bromo-3-clo-5-flo-2-hydroxy-benzoat (3,0 g, 11,0 mmol), triphenyl phosphin (4,19 g, 16,0 mmol), và *tert*-butyl (3S)-4-benzyl-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat (12 mL, 1,039M trong THF) trong THF (~50 mL) được làm nguội xuống 0 °C trong 10 phút. Diisopropyl azodicarboxylat (3,1 mL, 16 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào và hỗn hợp này được để cho ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi nguyên liệu ban đầu rượu được tiêu thụ hết, đá được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng được pha loãng với EtOAc. Hỗn hợp này được rửa hai lần bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa và lớp hữu cơ là làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* thành dầu màu hổ phách. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng 0-10% EtOAc/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (6,2 g, 99+%). Mẫu phân tích có độ tinh khiết ~ 95% thu được bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng 25-50% (1:1 EtOAc:DCM)/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu không màu. ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 585/587 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 92

tert-Butyl (3S)-3-[2-(3-bromo-2-clo-4-flo-6-metoxycacbonyl-phenoxy)etyl]piperazin-1-carboxylat

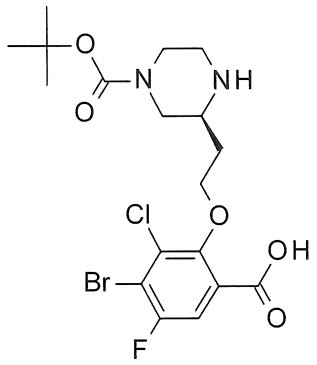


Dung dịch chứa *tert*-butyl (3S)-4-benzyl-3-[2-(3-bromo-2-clo-4-flo-6-metoxycacbonyl-phenoxy)etyl]piperazin-1-carboxylat (7,0 g, 11,35 mmol) trong DCM (75 mL) được bổ sung vào N,N-diisopropylamin (5,94 mL, 34,1 mmol). dung dịch được làm mát trong bể đá và 1-cloetyl clofomat (3,7 mL, 34 mmol) được bổ sung vào nhỏ giọt. Sau khi bổ sung, bể đá được lấy đi, và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 18 giờ. Một lượng 1-cloetyl clofomat nữa (2 mL, 17 mmol) và N,N-diisopropylamin (3 mL, 17 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào

ở nhiệt độ môi trường xung quanh và sau 7 giờ, một lượng 1-cloetyl clofomat nữa (0,60 mL, 5,67 mmol) và N,N-diisopropylamin (1 mL, 5,67 mmol) được bổ sung vào để tiêu thụ nguyên liệu ban đầu còn lại. Hỗn hợp phản ứng này được cô *trong chân không*. Bổ sung vào cặn toluen và hỗn hợp này được cô (lặp lại 2X). Chất bán rắn thu được được pha loãng với MeOH (100 mL) và khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh cho đến khi việc tạo thành sản phẩm kết thúc. Dung môi được loại bỏ *trong chân không* để tạo ra cặn màu hổ phách. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel rửa giải bằng 0-10% MeOH/DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (5,11 g, 91%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 495/497 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 93

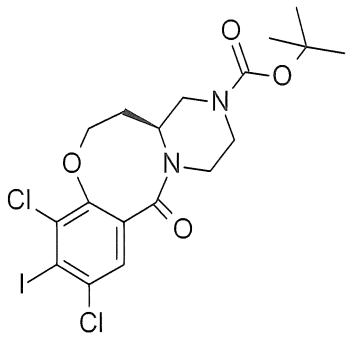
Axit 4-Bromo-2-[2-[(2S)-4-*tert*-butoxycacbonylpiperazin-2-yl]etoxy]-3-clo-5-flo-benzoic



Dung dịch chứa *tert*-butyl (3S)-3-[2-(3-bromo-2-clo-4-flo-6-metoxycacbonyl-phenoxy)etyl]piperazin-1-carboxylat (5 g, 10,08 mmol) trong THF (100 mL) và MeOH (12 mL) được làm mát bằng bể đá. Dung dịch nước chứa lithi hydroxit (6,5 mL, 6,25M) và nước khử ion (10 mL) được bổ sung vào. Bể đá được lấy đi và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau 3 giờ, đá được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này và độ pH được điều chỉnh đến giữa 5-6 bừng axit xitric 10% (12 mL). Dung dịch nước natri clorua bão hòa (100 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc (400 mL) và các lớp được tách riêng. Lớp nước được được chiết lại bằng EtOAc (300 mL) và các lớp hữu cơ đã gom được làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (4,83 g, 98%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 481/483 $[M+H]^+$.

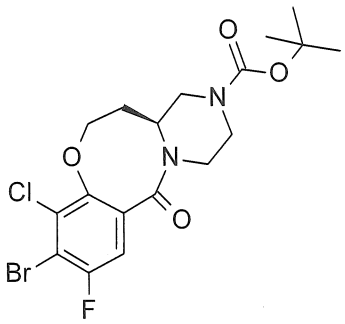
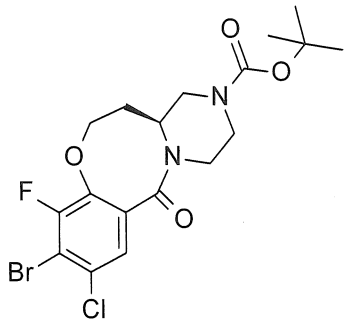
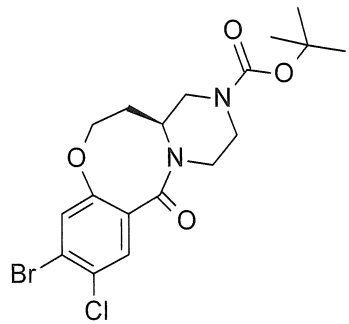
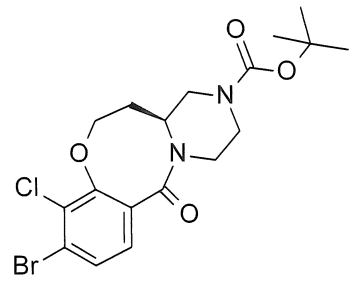
Ví dụ điều chế 94

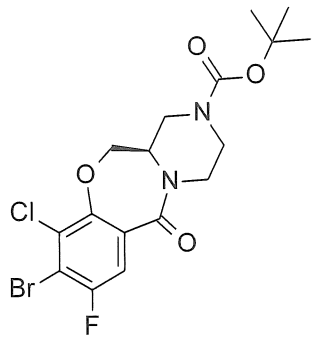
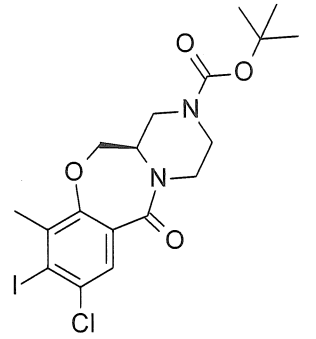
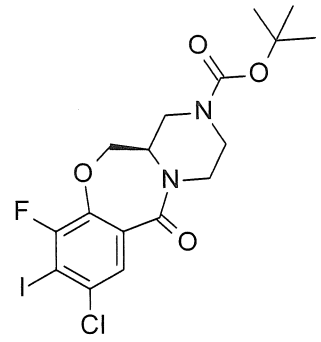
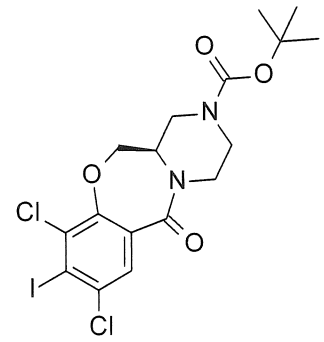
tert-Butyl (13aS)-8,10-diclo-9-iodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat

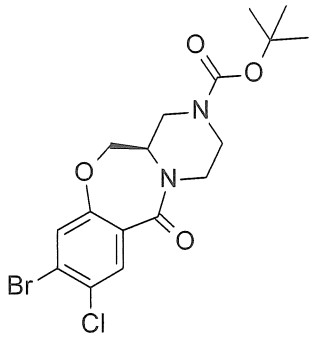
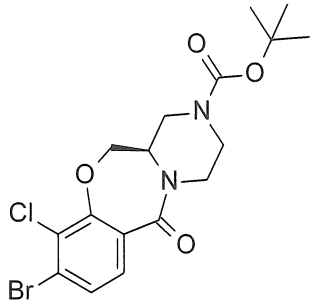
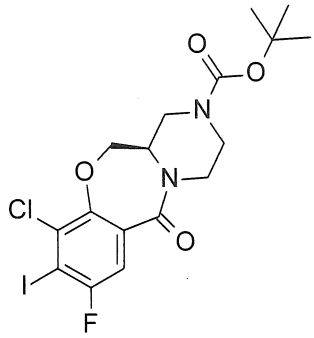
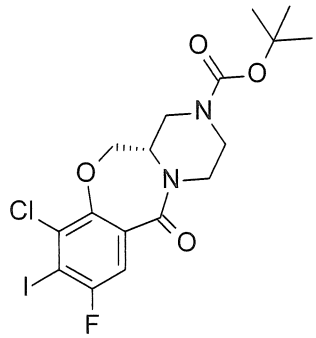


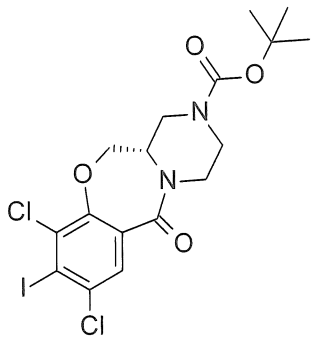
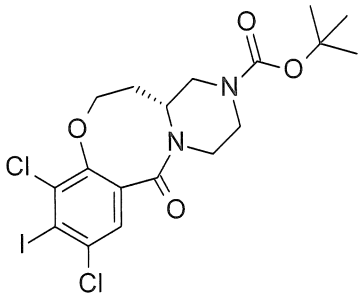
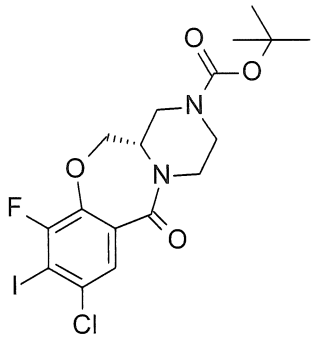
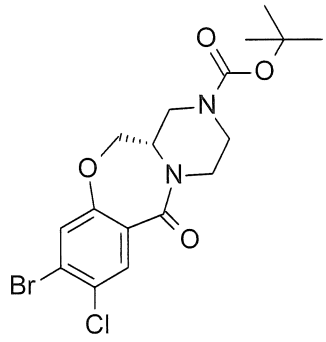
tert-Butyl (3S)-4-(3,5-diclo-2-flo-4-iodo-benzoyl)-3-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-carboxylat (4,438 g, 8,110 mmol) trong DMF (100 mL) được làm nguội xuống 0 °C và tiếp theo, dung dịch này được bổ sung chất rắn natri hydrua (60 % khối lượng trong dầu parafin) (0,81 g, 20 mmol). Sau 1 giờ ở 0 °C, hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa. Nước và EtOAc được bổ sung vào. Lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa hai lần bằng 0,2 M dung dịch nước lithi clorua, làm khô trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 30-50% EtOAc/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (3,394 g, 79%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 471/473 $[M\text{-}t\text{-}Bu+H]^+$.

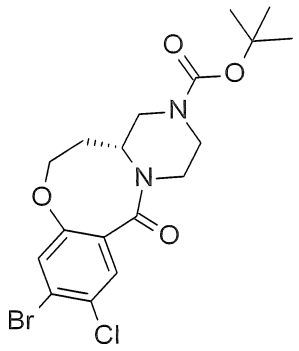
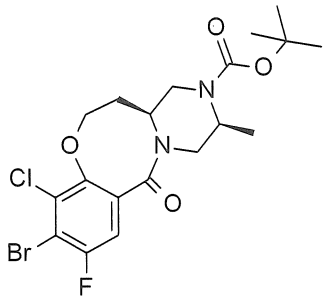
Bảng 14: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 94

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
95		*tert*-Butyl (13aS)-9-bromo-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	407,0/409,0
96		*tert*-Butyl (13aS)-9-bromo-8-clo-10-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	406,9/409,0
97		*tert*-Butyl (13aS)-9-bromo-8-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	388,8/390,8
98		*tert*-Butyl (13aS)-9-bromo-10-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	389,0/391,0

99		*tert*-Butyl (4aR)-8-bromo-7-clo-9-flo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	393,0/395,0
100		*tert*-Butyl (4aR)-7-clo-8-iodo-7-metyl-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	9437,0
101		*tert*-Butyl (4aR)-9-clo-7-flo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	441,0/443,0
102		*tert*-Butyl (4aR)-7,9-diclo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	456,8/458,8

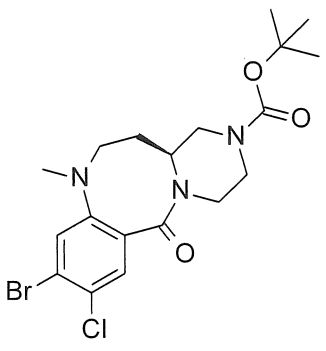
103		*tert*-Butyl (4aR)-8-bromo-9-clo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	374,8/376,8
104		*tert*-Butyl (4aR)-8-bromo-7-clo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	374,8/376,8
105		*tert*-Butyl (4aR)-7-clo-9-flo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	441,0/443,0
106		*tert*-Butyl (4aS)-7-clo-9-flo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	441,0/443,0

107		*tert*-Butyl (4aS)-7,9-diclo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	456,9/458,9
108		*tert*-Butyl (13aR)-8,10-diclo-9-iodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	470,8/472,8
109		*tert*-Butyl (4aS)-9-clo-7-flo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	441,0/443,0
110		*tert*-Butyl (4aS)-8-bromo-9-clo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	374,8/376,8

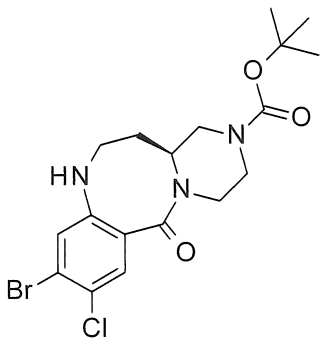
111		*tert*-Butyl (13aR)-9-bromo-8-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	388,8/390,8
112		*tert*-Butyl (3S,13aS)-9-bromo-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	421,0/423,0

Ví dụ điều chế chuẩn bị 113

tert-Butyl (13aS)-9-bromo-8-clo-11-metyl-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazoxin-2-carboxylat và *tert*-Butyl (13aS)-9-bromo-8-clo-6-oxo-3,4,11,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazoxin-2-carboxylat



và

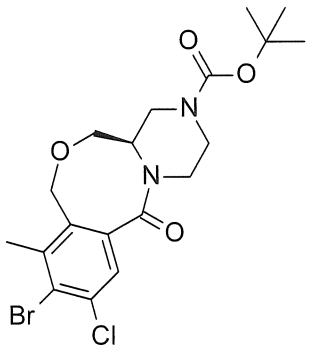


tert-Butyl (3S)-4-(2-amino-4-bromo-5-clo-benzoyl)-3-[2-(p-tolylsulfonyloxy)etyl]piperazin-1-carboxylat (473 mg, 0,767 mmol) trong DMF (15 mL) được làm nguội xuống 0 °C và tiếp theo, dung dịch này được bổ sung chất rắn natri hydrua (60 % khối lượng trong dầu parafin) (49 mg, 1,225 mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 0 °C trong 2 giờ trước khi để ấm đến nhiệt độ môi trường xung

quanh và khuấy trong 2 giờ nữa. Sau thời gian này, hỗn hợp phản ứng này được làm nguội xuống -78 °C và metyl iodua (50 µL, 0,803 mmol) được bổ sung vào. Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng này được làm ấm đến 0 °C và được khuấy trong 18 giờ và làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp này được làm mát lại xuống 0 °C và một lượng metyl iodua nữa (50 µL, 0,803 mmol) được bổ sung vào. Sau 1 giờ, không quan sát thấy việc metyl hóa nữa, hỗn hợp phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và trietylamin (100 µL, 0,717 mmol) được bổ sung vào. Sau 1 giờ nữa, hỗn hợp phản ứng này được tôi với nước, pha loãng với bão hòa dung dịch nước NH_4Cl dung dịch và EtOAc. Các lớp được tách riêng và dung dịch nước được chiết hai lần nữa with EtOAc. Gom các lớp hữu cơ rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên natri sulfat, và cô *trong chân không*. Chất rắn thu được là nghiền với ACN và làm khô trong chân không không cần tinh chế thêm để tạo ra hỗn hợp gồm các hợp chất nêu ở đề mục này (3:2 NH với NMe, 345 mg, 99+%). ES/MS m/z ($^{79}Br/^{81}Br$) 444,0/446,0 $[M+H]^+$ và 458,0/460,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 114

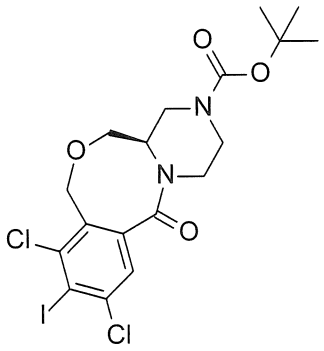
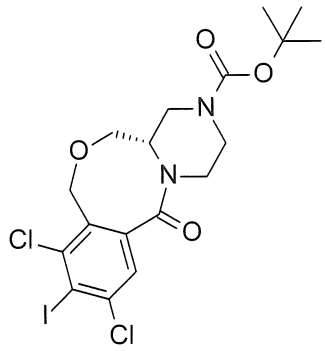
tert-Butyl (13aR)-9-bromo-8-clo-10-metyl-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat



Dung dịch chứa hydroclorua của axit 4-bromo-2-[[(2R)-4-*tert*-butoxycacbonylpiperazin-2-yl]metoxymetyl]-5-clo-3-metyl-benzoic (500 mg, 0,749 mmol) và DIEA (0,39 mL, 2,2 mmol) trong DMF (3,7 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa HATU (581 mg, 1,50 mmol) trong DMF (3,7 mL) ở 0 °C. Hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 1 giờ và ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút. Trong bình phản ứng riêng biệt, dung dịch chứa hydroclorua của axit 4-bromo-2-

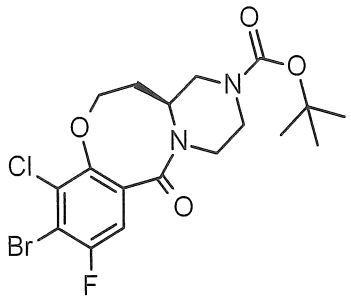
[[(2R)-4-*tert*-butoxycacbonylpiperazin-2-yl]metoxymetyl]-5-clo-3-metyl-benzoic (2,62 g, 3,92 mmol, độ tinh khiết 77%) và DIEA (2,1 mL, 12 mmol) trong DMF (20 mL) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa HATU (3,04 g, 7,84 mmol) trong DMF (20 mL) ở 0 °C. Hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 1 giờ và ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút. Gom hai hỗn hợp phản ứng này, pha loãng với EtOAc, và rửa bằng dung dịch HCl 0,5M, nước, dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa, và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Lớp hữu cơ là làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Các chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 0-65% EtOAc/hexan. Các phân đoạn tinh khiết được cô *trong chân không*. Bổ sung vào cặn DCM và hỗn hợp này được cô *trong chân không và* cho vào chân không trong 3 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (1,95 g, 86%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 459/461 $[M+H]^+$.

Bảng 15: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 114

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
115		*tert*-Butyl (13aR)-8,10-diclo-9-iodo-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	527,2/529,0
116		*tert*-Butyl (13aS)-8,10-diclo-9-iodo-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	471,0/473,0

Ví dụ điều chế chuẩn bị 117

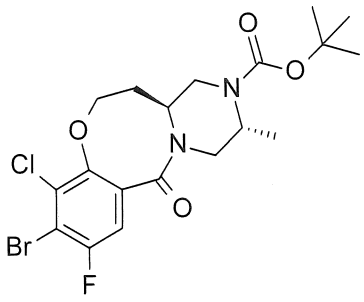
tert-Butyl (13aS)-9-bromo-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat



Dung dịch chứa axit 4-bromo-2-[2-[(2S)-4-*tert*-butoxycacbonylpiperazin-2-yl]etoxy]-3-clo-5-flo-benzoic (4,8 g, 10 mmol) trong DCM (50 mL), được làm mát bằng bể đá, bổ sung vào TEA (2,8 mL, 20 mmol). Propylphosphonic anhydrit (11 mL, 18,8 mmol, 50 % khối lượng trong EtOAc) được bổ sung vào nhỏ giọt. Sau khi bổ sung, hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút. DCM (250 mL) và dung dịch amoni clorua bão hòa (100 mL) được bổ sung vào. Lớp nước được loại bỏ và chiết bằng DCM (100 mL) và các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa (100 mL), làm khô trên natri sulfat, và lọc. Dịch lọc được xử lý bằng activated charcoal (3,5 g) và được khuấy trong 10 phút. Hỗn hợp này được lọc qua đệm đất tảo và cô *trong chân không* thành dầu. Clorofom được bổ sung vào và cô *trong chân không* (lặp lại 2X) để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (4,64 g, 99%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 407/409 $[M\text{-}t\text{-}Bu+H]^+$.

Ví dụ điều chế 118

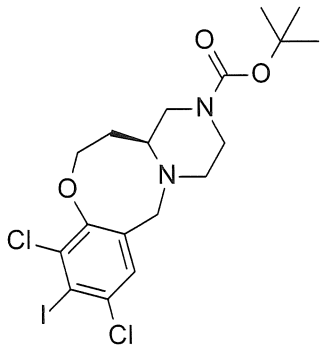
tert-Butyl (3R,13aS)-9-bromo-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat



Dung dịch chứa metyl 4-bromo-3-clo-2,5-diflo-benzoat (1,00 g, 3,50 mmol) và *tert*-butyl (2R,5S)-5-(2-hydroxyetyl)-2-metyl-piperazin-1-carboxylat (1,07 g, 4,38 mmol) trong DMF (17,5 mL) được làm mát bằng bể đá. Xeri cacbonat (2,31 g, 7,01 mmol) được bổ sung vào. hỗn hợp phản ứng được để cho từ từ ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm. Sau 18 giờ, hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến 80 °C trong 24 giờ. Sau khi làm mát xuống nhiệt độ trong phòng, một nửa dung dịch nước natri clorua bão hòa (50 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc (100 mL) và các lớp được tách riêng. Lớp nước được chiết hai lần nữa bằng EtOAc (50 mL) và gom các lớp hữu cơ rửa bằng nước (2 × 50 mL), dung dịch nước natri clorua bão hòa (50 mL), và tiếp theo, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô trong chân không. Các chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 0-100% MTBE/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn (690 mg, 41%). ES/MS m/z (^{79}Br/^{81}Br) 476,0/478,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 119

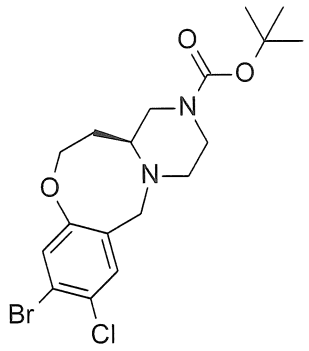
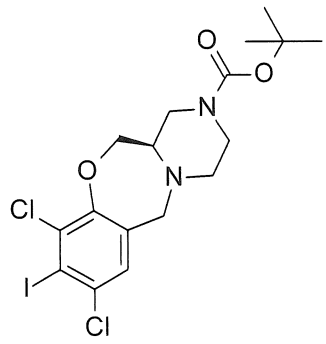
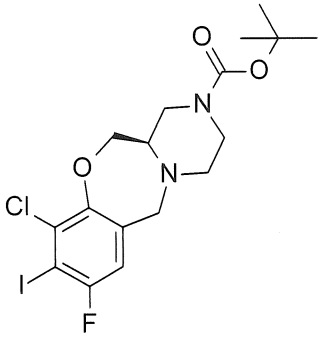
tert-Butyl (13aS)-8,10-diclo-9-iodo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat

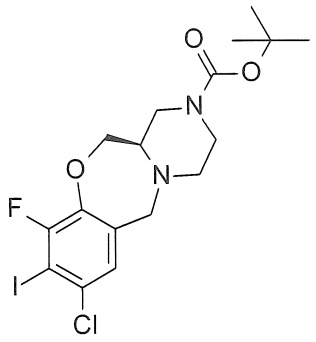
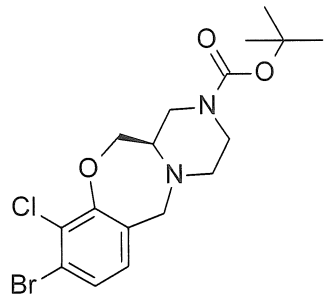
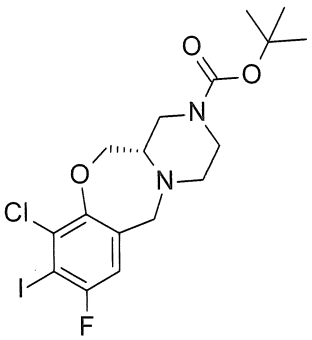
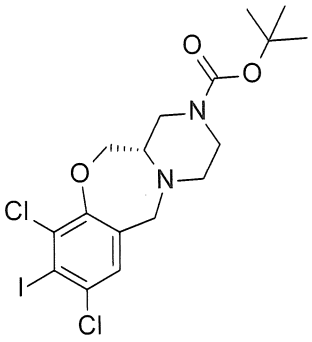


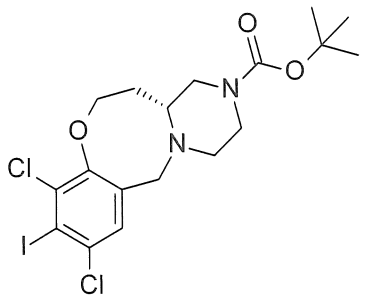
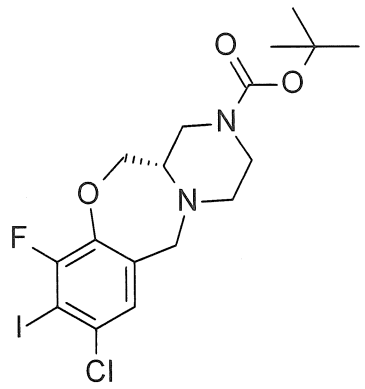
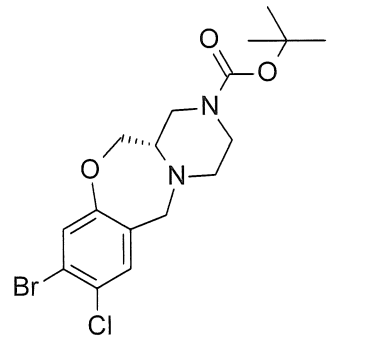
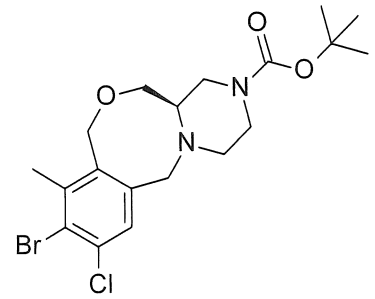
1M boran dimetyl sulfua phức trong THF (2 mL, 2 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp đang khuấy chứa *tert*-butyl (13aS)-8,10-diclo-9-iodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat (1,0 g, 1,9 mmol) trong THF (20 mL) và đun nóng đến hồi lưu trong 18 giờ. Sau thời gian này, một lượng phức boran dimetyl sulfua 1M nữa trong THF (2 mL, 2 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này và được khuấy ở hồi lưu trong 5 giờ nữa. Hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh, được tôi cẩn thận với MeOH, và cô *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng

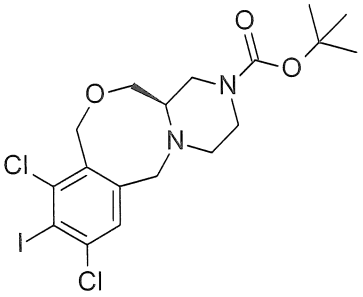
30-70% EtOAc/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (900 mg, 90%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 512,8/514,8 $[M+H]^{+}$.

Bảng 16: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 119

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
120		*tert*-Butyl (13aS)-9-bromo-8-clo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	430,9/433,0
121		*tert*-Butyl (4aR)-7,9-diclo-8-iodo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	498,8/500,8
122		*tert*-Butyl (4aR)-7-clo-9-flo-8-iodo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	483,2/485,2

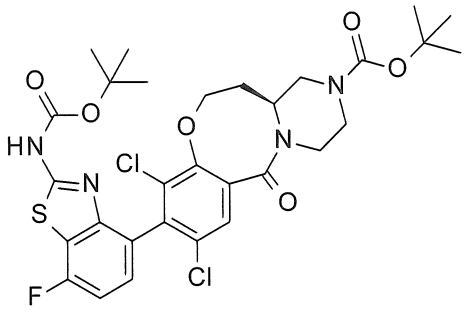
123		*tert*-Butyl (4aR)-9-clo-7-flo-8-iodo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	483,0/485,0
124		*tert*-Butyl (4aR)-8-bromo-7-clo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	417,0/419,0
125		*tert*-Butyl (4aS)-7-clo-9-flo-8-iodo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	483,2/485,2
126		*tert*-Butyl (4aS)-7,9-diclo-8-iodo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	499,0/501,0

127		*tert*-Butyl (13aR)-8,10-diclo-9-iodo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	512,9/514,8
128		*tert*-Butyl (4aS)-9-clo-7-flo-8-iodo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	483,0/485,0
129		*tert*-Butyl (4aS)-8-bromo-9-clo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	416,8/419,0
130		*tert*-Butyl (13aR)-9-bromo-8-clo-10-metyl-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	445,2/447,2

131		*tert*-Butyl (13aR)-8,10-diclo-9-iodo-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	513,2/515,2

Ví dụ điều chế chuẩn bị 132

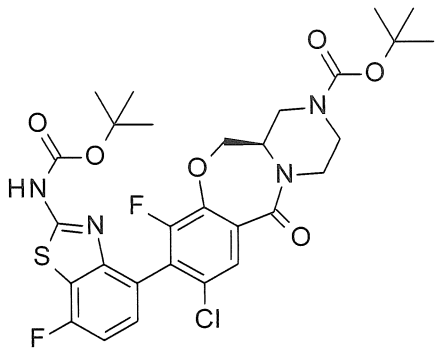
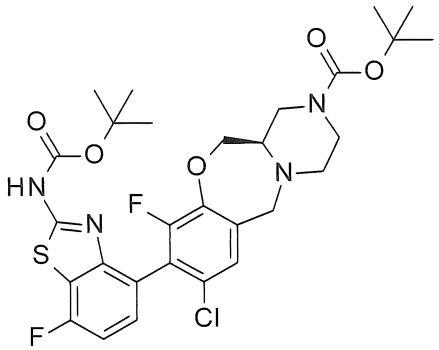
tert-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat

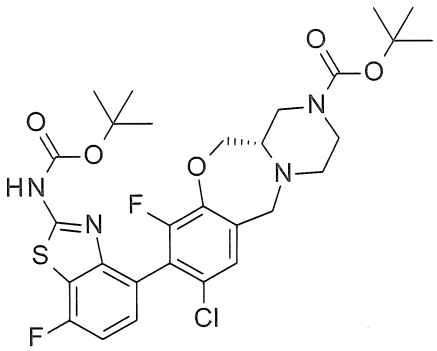
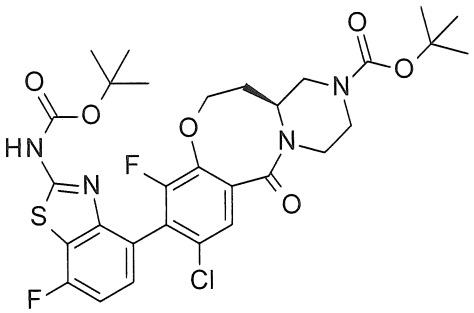
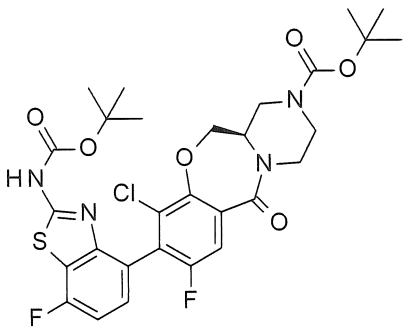


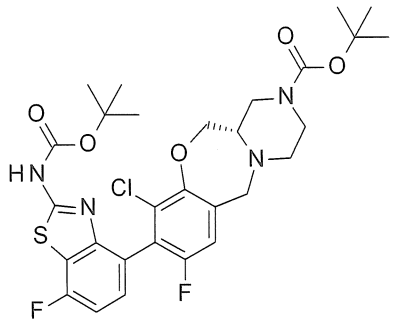
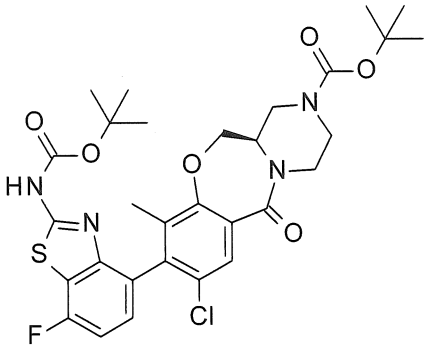
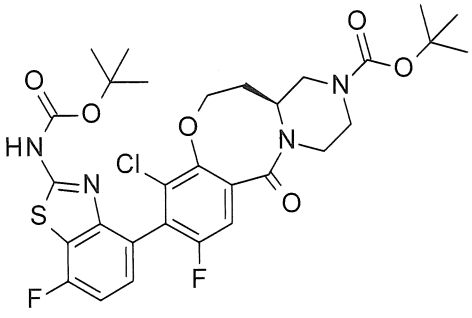
Ống bịt được bằng nắp vặn có thanh khuấy được bổ sung vào *tert*-butyl (13aS)-8,10-diclo-9-iodo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat (750 mg, 1,423 mmol), axit [2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]boronic (650 mg, 2,083 mmol), kali phosphat tribasic (450 mg, 2,12 mmol), và 1,1'-bis(di-*tert*-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (100 mg, 0,15 mmol). 1,4-dioxan đã loại khí và trộn trước (15 mL) và nước (5 mL) được bổ sung và hỗn hợp này được làm sạch bằng nitơ trong 20 phút. Ống này được đậy nắp và đun nóng ở 80 °C trong 1 giờ. Tiếp theo, rót hỗn hợp phản ứng này vào nước, dung dịch nước natri clorua bão hòa, và EtOAc. Các lớp được tách riêng, và lớp nước được chiết một lần bằng EtOAc. Làm khô các dịch chiết hữu cơ thu gom được trên magie sulfat khan, lọc, và cô *trong chân không*. Các chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải

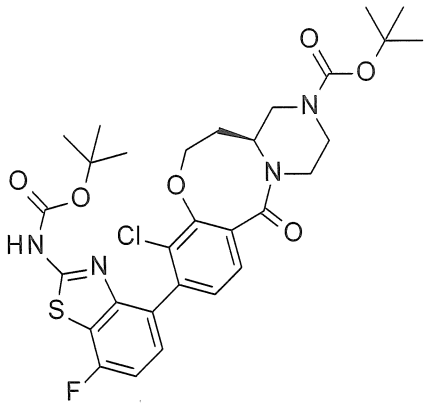
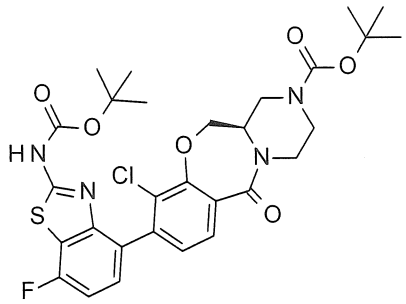
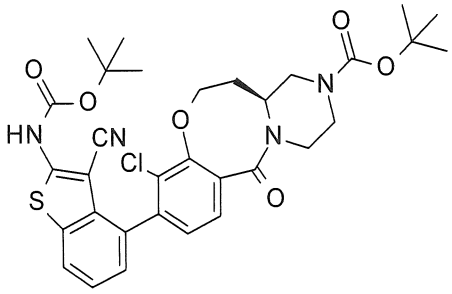
bằng 30-70% EtOAc/hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (724 mg, 76%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 667/669 $[M+H]^+$. Tỉ lệ 45:55 củachất đồng phân atropi (LC).

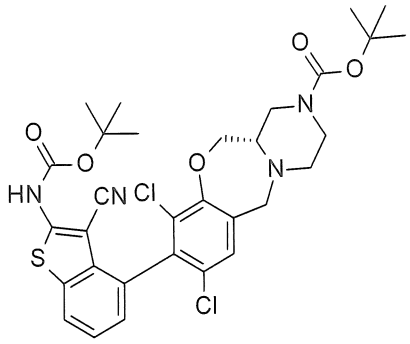
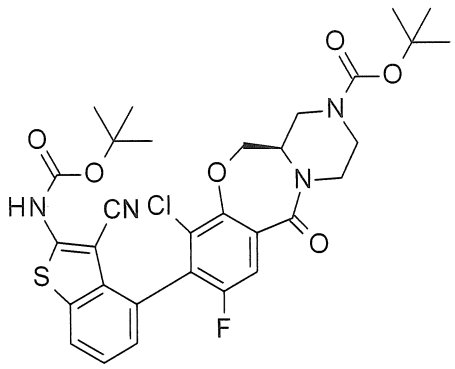
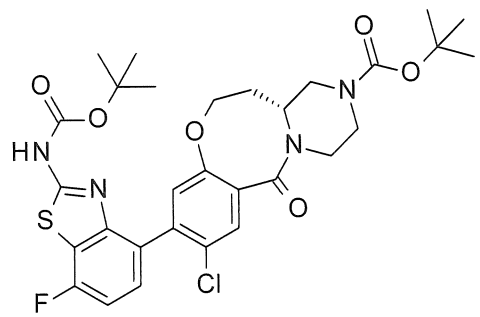
Bảng 17: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 132

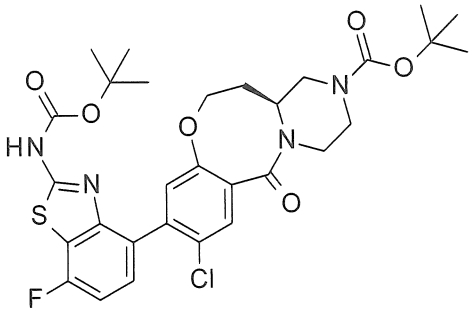
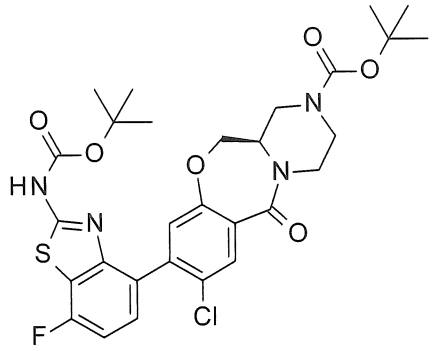
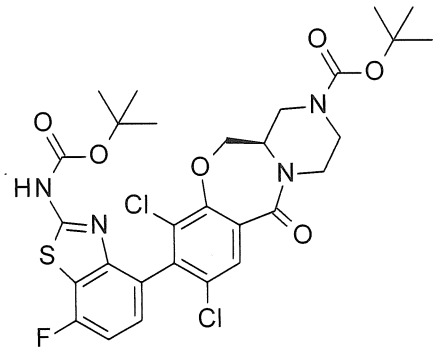
Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
133		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-7-flo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	537,2/539,2
134		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-7-flo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	623,2/625,2

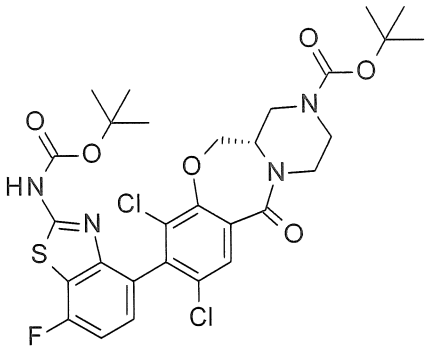
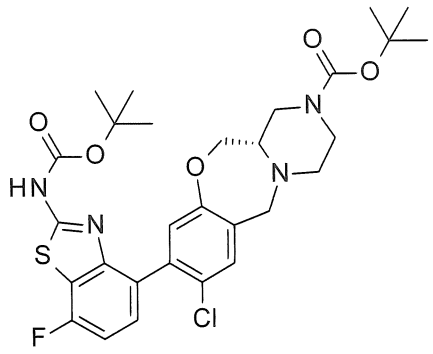
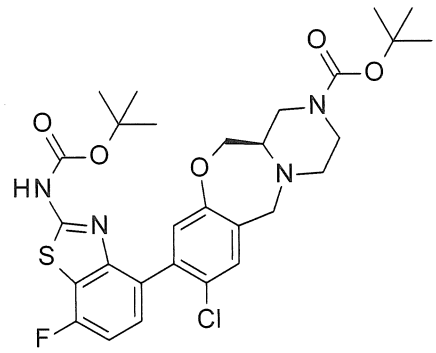
135		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-7-flo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	623,2/625,2
136		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-10-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	551,1/553,1
137		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7-clo-9-flo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	537,2/539,2

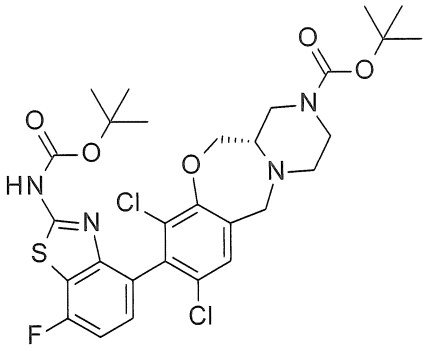
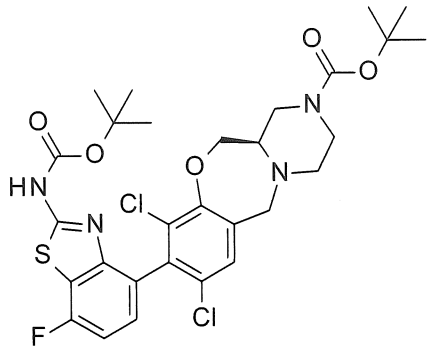
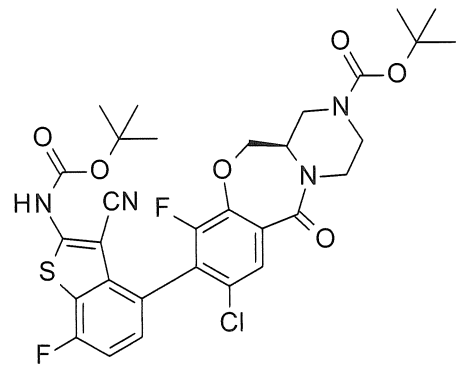
138		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7-clo-9-flo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	623,4/625,4
139		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-7-metyl-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	533,2/534,2
140		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	551,0/553,0

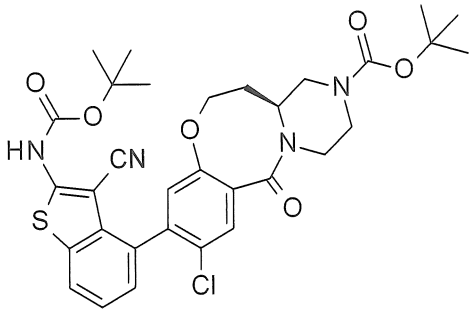
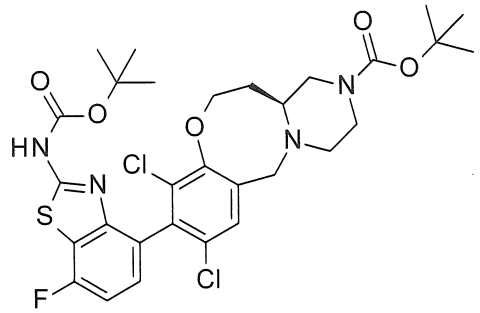
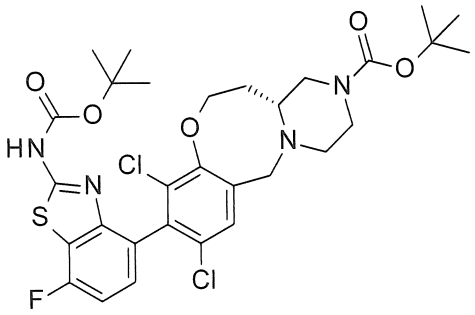
141		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-10-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	533,0/535,0
142		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7-clo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	519,0/521,0
143		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-10-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	539,0/541,0

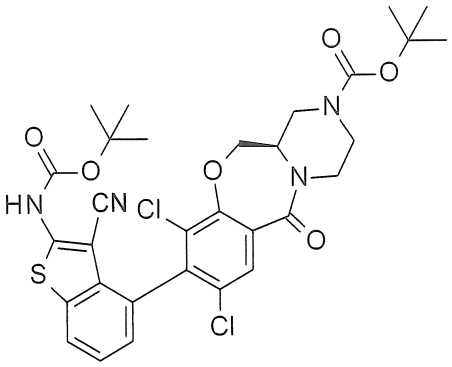
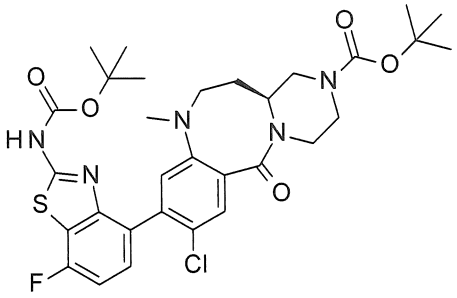
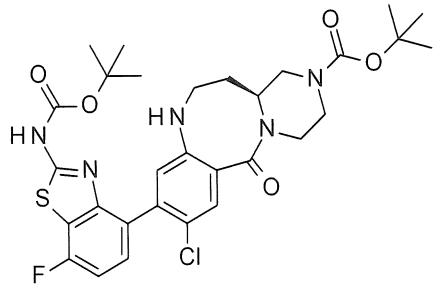
144		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-7,9-diclo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	645,4/647,4
145		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-7-clo-9-flo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	587,2/589,2
146		*tert*-Butyl (13aR)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	533,0/535,0

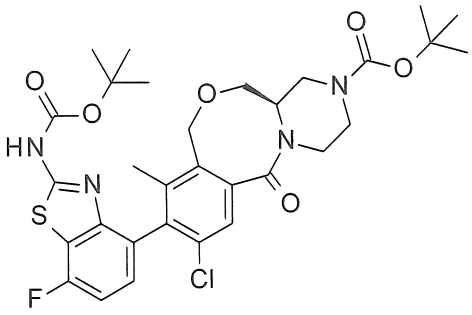
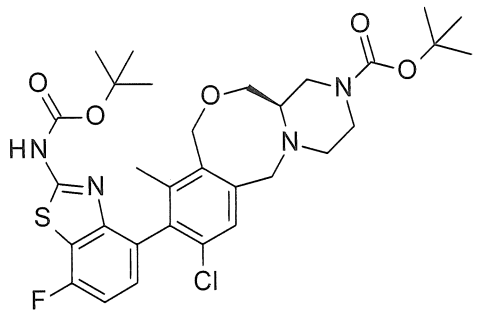
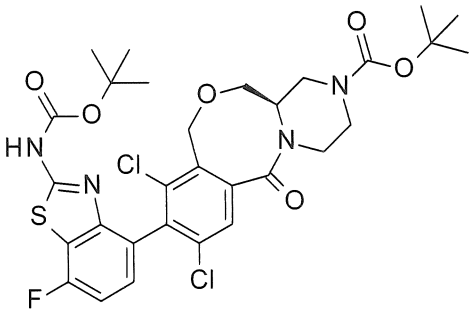
147		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	533,0/535,0
148		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	519,0/521,0
149		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7,9-diclo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	553,0/555,0

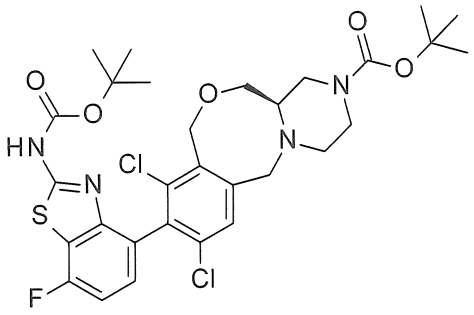
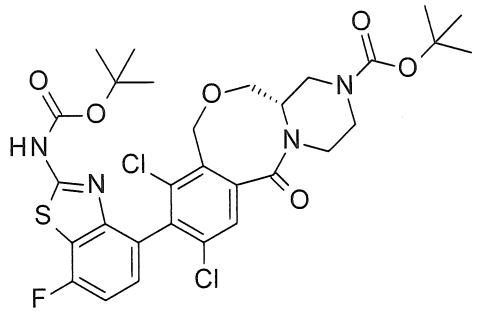
150		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7,9-diclo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	553,0/555,0
151		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	605,0/607,0
152		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-9-clo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	605,0/607,0

153		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7,9-diclo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	639,0/641,0
154		*tert*-Butyl (4aS)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-7,9-diclo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	639,0/641,0
155		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl]-9-clo-7-flo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	605,0/607,0

156		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-8-clo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	639,2/641,2
157		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	653,0/655,2
158		*tert*-Butyl (13aR)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	653,0/655,0

159		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-7,9-diclo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	603,0/605,0
160		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-11-metyl-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazoxin-2-carboxylat	646,2/648,2
161		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-6-oxo-3,4,11,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazoxin-2-carboxylat	632,2/634,2

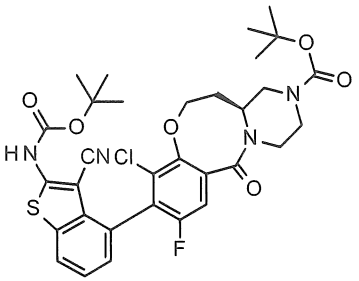
162		*tert*-Butyl (13aR)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-10-metyl-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	645,2/647,2
163		*tert*-Butyl (13aR)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8-clo-10-metyl-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	633,4/635,4
164		*tert*-Butyl (13aR)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-6-oxo-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	665,2/667,2

165		*tert*-Butyl (13aR)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	653,4/655,2
166		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	665,2/667,2

Trong một số trường hợp, K_2CO_3 được sử dụng thay cho K_3PO_4

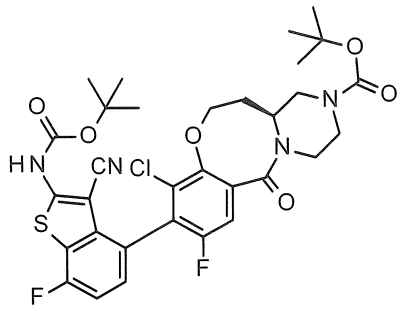
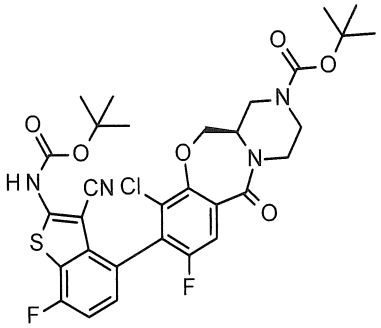
Ví dụ điều chế 167

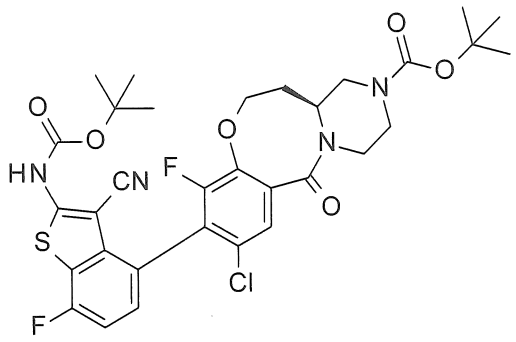
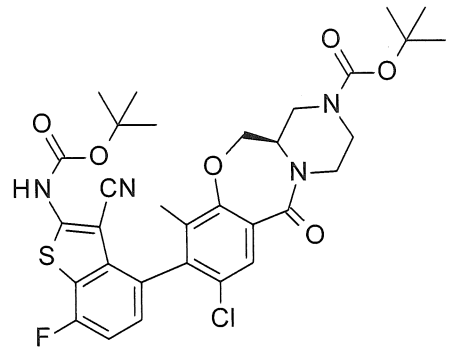
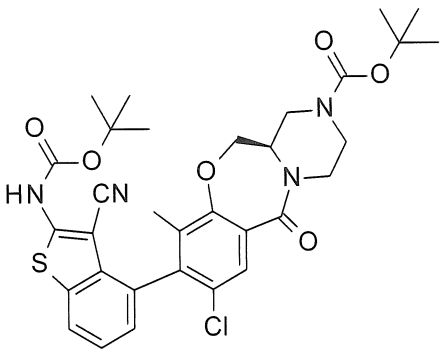
tert-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat

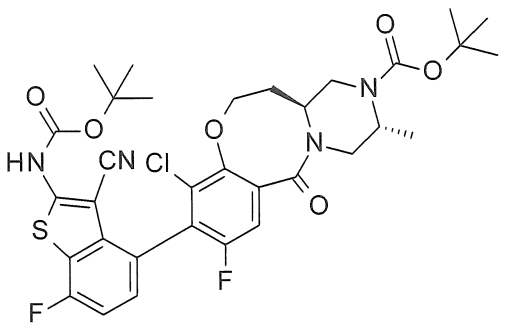
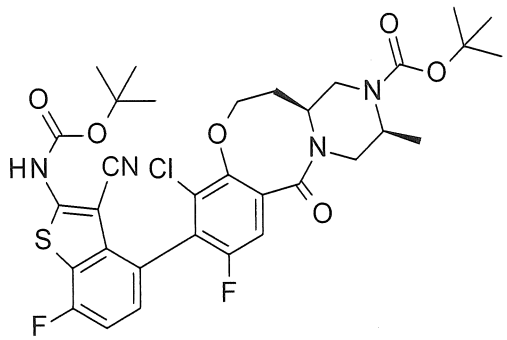


Bình phản ứng được bịt kín được bổ sung toluen (300 mL), *tert*-butyl (13aS)-9-bromo-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat (6,20 g, 11,0 mmol), và *tert*-butyl N-[3-xyano-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzothiophen-2-yl]carbamat (6,20 g, 15,5 mmol). Hỗn hợp này được vảy nitơ trong 30 phút, và tiếp theo, $DPEPhosPdCl_2$ (1,20 g, 1,68 mmol) được bổ sung vào, tiếp theo là xeri cacbonat (9,00 g, 27,6 mmol). Bình phản ứng là được bịt kín và được khuấy ở 105 °C trong 6 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và lọc qua đất tảo, rửa bằng EtOAc, và dịch lọc được cô *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải bằng 0-30% axeton/hexan. Chất đồng phân không đối quang mong muốn được rửa giải sau một chất không mong muốn để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (phần chủ yếu, 3,50 g, 49%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 657,0/659,0 $[M+H]^+$.

Bảng 18: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 167

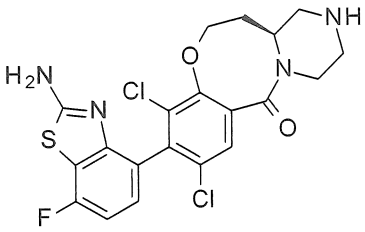
Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
168		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl]-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	675,2/677,2
169		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl]-7-clo-9-flo-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	605,2/607,2

170		*tert*-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl]-8-clo-10-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	675,2/677,2
171		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-3-metyl-benzothiophen-4-yl]-9-clo-7-metyl-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	601,2/603,3
172		*tert*-Butyl (4aR)-8-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-metyl-benzothiophen-4-yl]-9-clo-7-metyl-11-oxo-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-	583,2/585,2

		c][1,4]benzoxazepin-3-carboxylat	
173		*tert*-Butyl (3R,13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl]-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	689,2/691,2
174		*tert*-Butyl (3S,13aS)-9-[2-(tert-butoxycacbonylamino)-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl]-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat	633,4/635,4

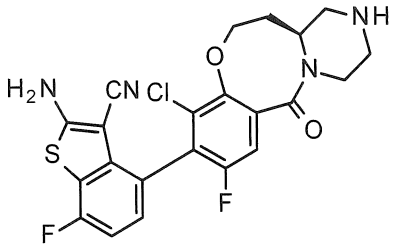
Ví dụ điều chế chuẩn bị 175

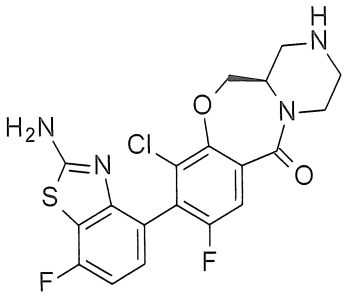
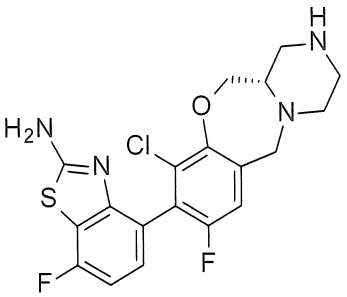
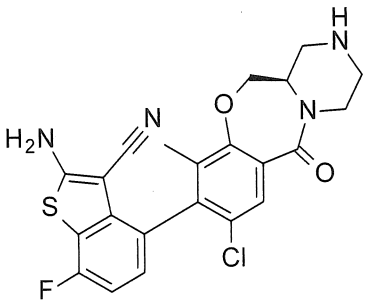
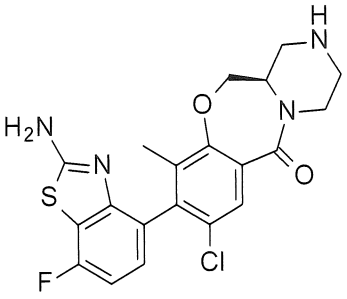
(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on

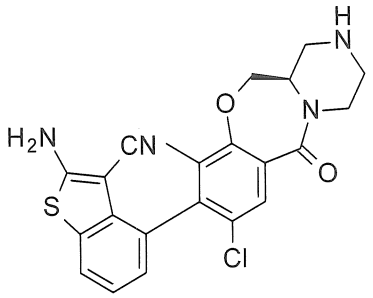
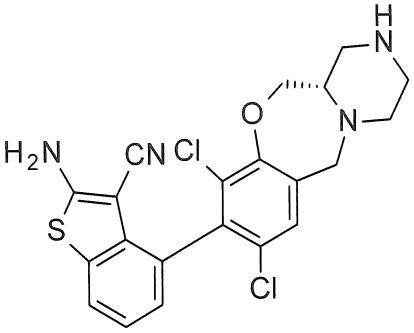
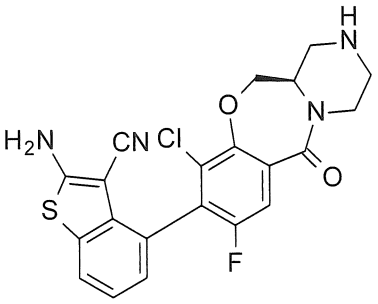
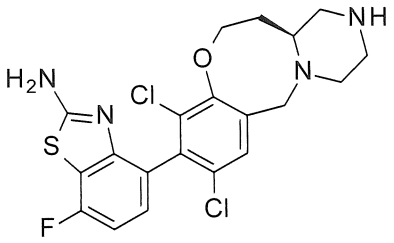


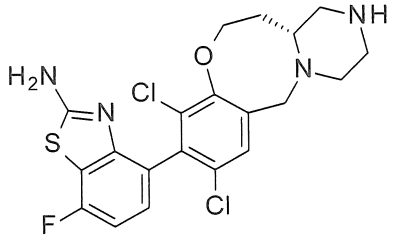
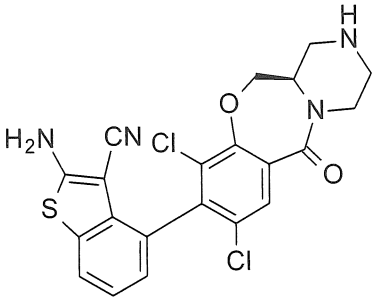
tert-Butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl]-8,10-diclo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat (724 mg, 1,084 mmol) được hòa tan trong DCM (4 mL) và TFA (2 mL, 26,45 mmol) và được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau 6 giờ, hỗn hợp này được cô *trong chân không*. Chất thô được nạp vào cột SCX, rửa bằng MeOH, và rửa giải bằng dung dịch NH_3 7N trong MeOH. Dịch lọc được cô *trong chân không* để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (500 mg, 98%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 467/469 $[M+H]^+$.

Bảng 19: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 175

Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
176		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	475,0/477,0

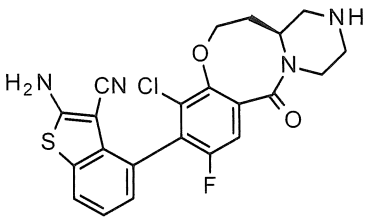
177		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7-clo-9-flo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	437,2/439,2
178		4-[(4aS)-7-clo-9-flo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	423,2/425,2
179		4-[(4aR)-9-clo-7-metyl-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	457,2/459,2
180		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-7-metyl-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	433,2/435,2

181		(4aR)-8-(2-Amino-3-metyl-benzothiophen-4-yl)-9-clo-7-metyl-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	439,1/441,2
182		4-[(4aS)-7,9-Diclo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	445,0/447,0
183		4-[(4aR)-7-clo-9-flo-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	443,2/445,2
184		4-[(13aS)-8,10-Diclo-1,2,3,4,6,12,13,13a-octahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-	453,0/455,0

		yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	
185		4-[(13aR)-8,10-Diclo-1,2,3,4,6,12,13,13a-octahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	453,0/455,0
186		4-[(4aR)-7,9-Diclo-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	458,9/460,9

Ví dụ điều chế chuẩn bị 187

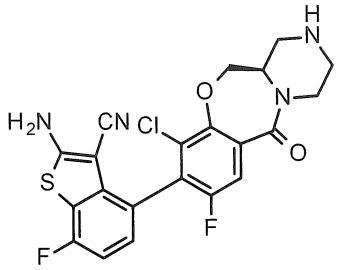
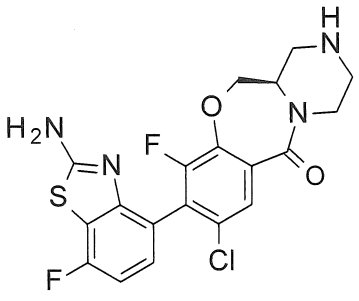
4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril

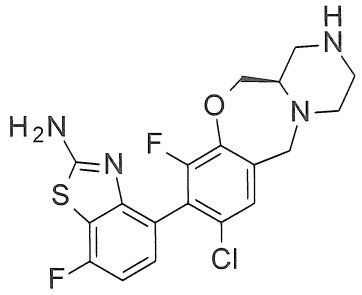
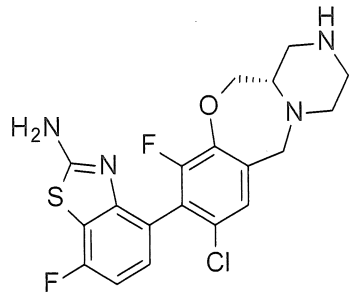
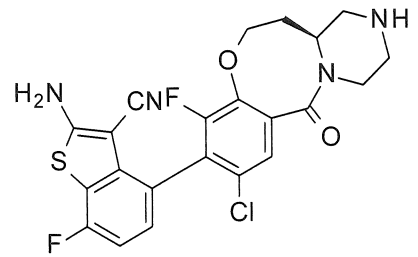
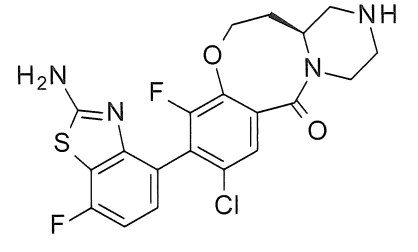


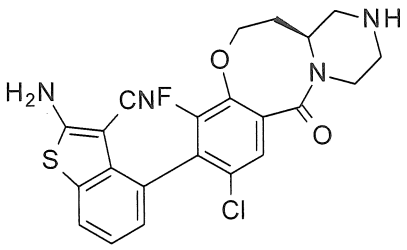
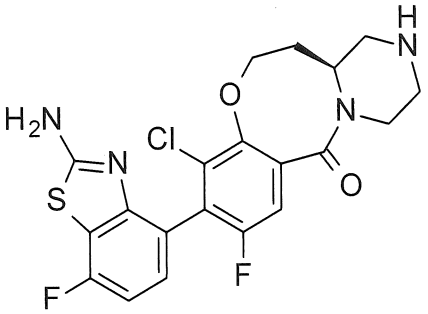
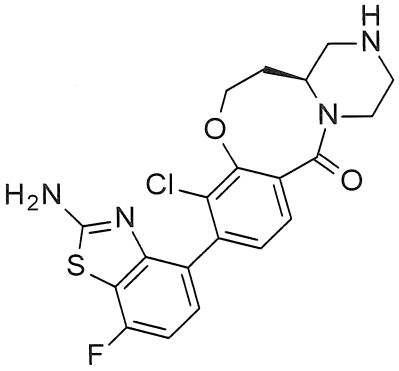
Huyền phù chứa *tert*-butyl (13aS)-9-[2-(*tert*-butoxycacbonylamino)-3-xyano-benzothiophen-4-yl]-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-carboxylat (2,64 g, 4,02 mmol) trong DCM (10,0 mL) ở 0 °C được bổ sung vào TFA (10 mL) nhỏ giọt. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 giờ. Hỗn hợp này được cô *trong chân không*, được hòa tan trong EtOAc, và cô *trong chân không* một lần nữa. Quy trình này được lặp lại một lần

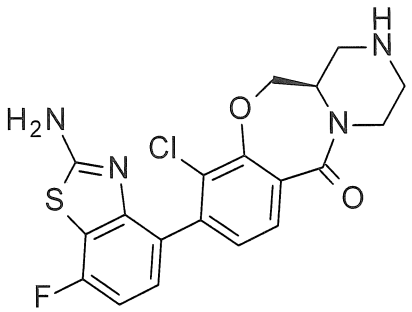
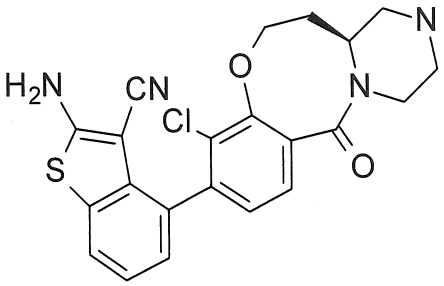
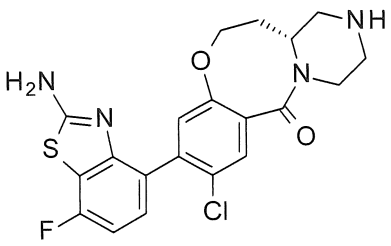
nữa. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải lần đầu bằng 0-80% (10% MeOH trong DCM)/DCM, và lần thứ hai bằng 0-100% [10% (NH_3 7N trong MeOH) trong DCM]/DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (1,58 g, 86%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 457,0/459,0 $[M+H]^+$.

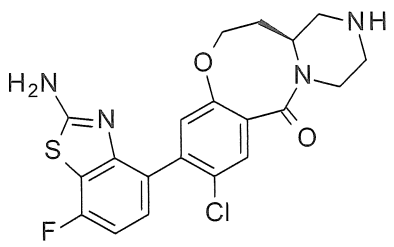
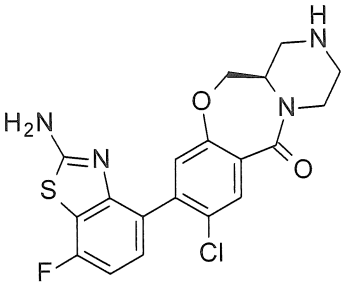
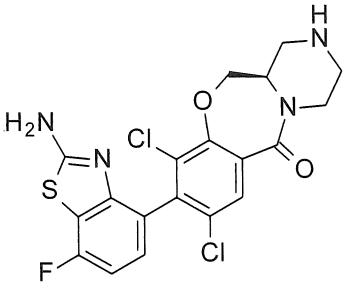
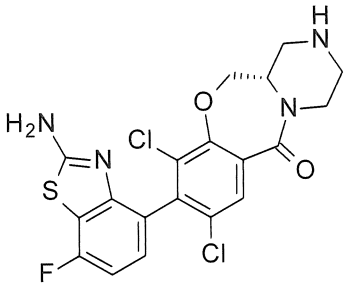
Bảng 20: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ điều chế 187

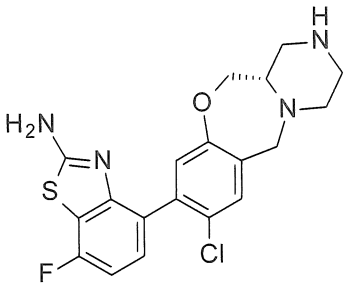
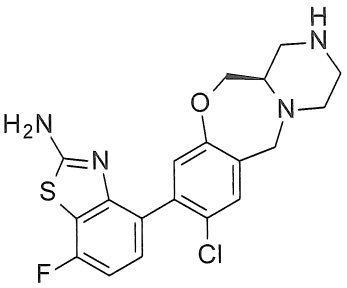
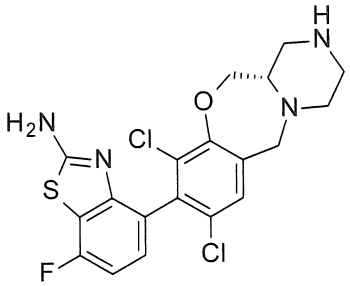
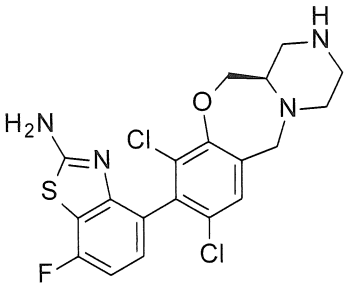
Ví dụ điều chế	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
188		4-[(4aR)-9-clo-7-flo-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	461,0/463,0
189		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-7-flo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	437,0/439,0

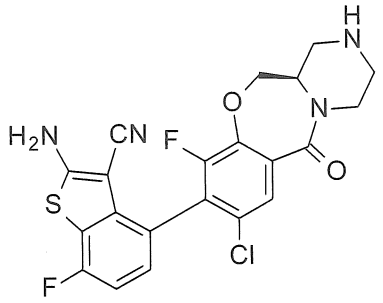
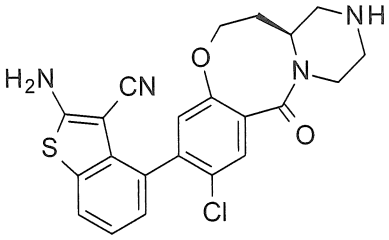
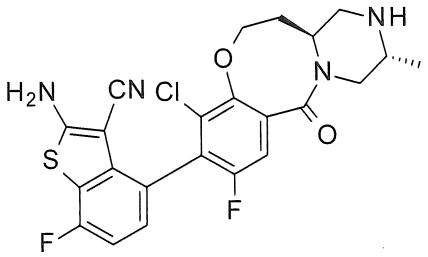
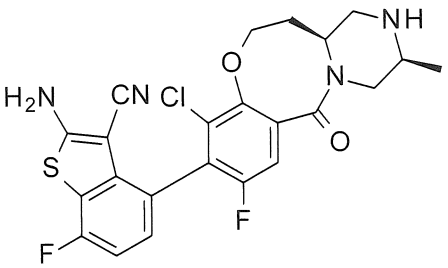
190		4-[(4aR)-9-clo-7-flo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	423,0/425,0
191		4-[(4aS)-9-clo-7-flo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	423,0/425,0
192		4-[(13aS)-8-clo-10-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	475,0/477,0
193		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-10-flo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-	451,0/453,0

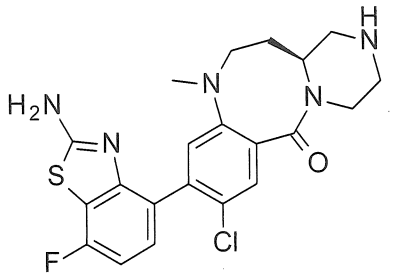
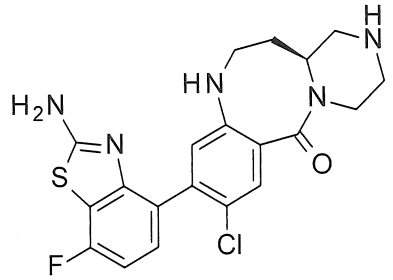
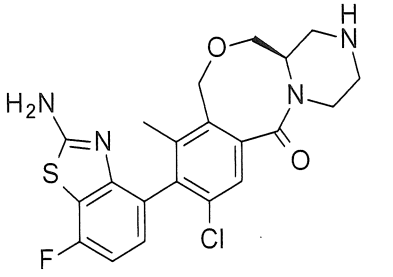
		pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	
194		4-[(13aS)-8-clo-10-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	457,0/459,0
195		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-10-clo-8-flo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	451,0/453,0
196		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-10-clo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	433,0/435,0

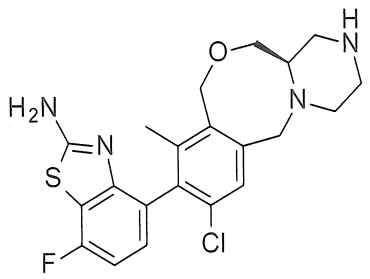
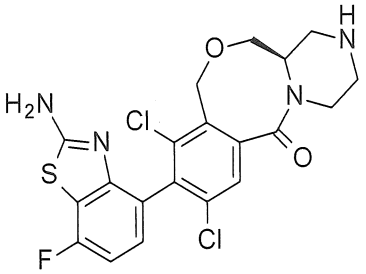
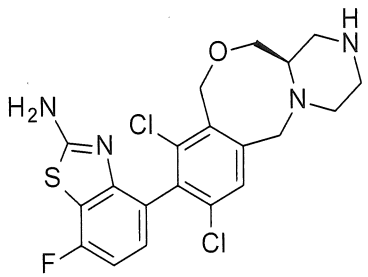
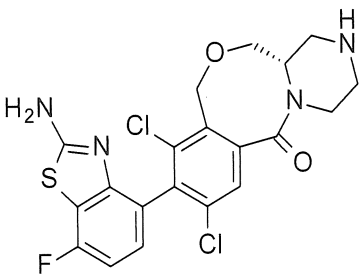
197		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7-clo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	419,0/421,0
198		4-[(13aS)-10-clo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	439,0/441,0
199		(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	433,0/435,0

200		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	432,9/435,0
201		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	418,9/420,9
202		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	452,8/454,8
203		(4aS)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	452,8/454,8

204		4-[(4aS)-9-clo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	405,0/407,0
205		4-[(4aR)-9-clo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	405,0/407,0
206		4-[(4aS)-7,9-Diclo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	438,9/441,0
207		4-[(4aR)-7,9-Diclo-2,3,4,4a,5,11-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	438,8/440,9

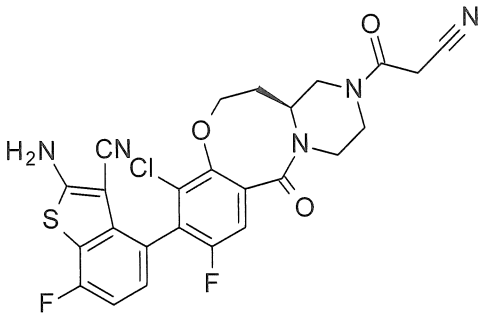
208		4-[(4aR)-9-clo-7-flo-11-oxo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	461,0/463,0
209		4-[(13aS)-8-clo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	439,0/441,0
210		4-[(3R,13aS)-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	489,0/491,0
211		4-[(3S,13aS)-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-	489,2/491,2

		yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	
212		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-11-metyl-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-on	446,0/448,0
213		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-1,2,3,4,11,12,13,13a-octahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-on	432,0/434,0
214		(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-10-metyl-2,3,4,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-6-on	447,2/449,2

215		4-[(13aR)-8-clo-10-metyl-1,2,3,4,6,11,13,13a-octahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-9-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	433,2/435,2
216		(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2,3,4,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-6-on	467,2/469,2
217		4-[(13aR)-8,10-Diclo-1,2,3,4,6,11,13,13a-octahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-9-yl]-7-flo-1,3-benzothiazol-2-amin	453,2/455,2
218		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2,3,4,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-6-on	467,2/469,2

Ví dụ điều chế chuẩn bị 219

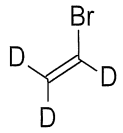
4-[(13aS)-10-clo-2-(2-xyanoaxetyl)-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril



Axit xyanoaxetic (138 mg, 1,61 mmol), 1-hydroxybenzotriazol (222 mg, 1,61 mmol), DIEA (0,5 mL, 3 mmol), và 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua (306 mg, 1,60 mmol) được bổ sung vào huyền phù chứa 4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril (500 mg, 1,05 mmol) trong DCM (10 mL). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 18 giờ trước khi pha loãng với DCM và rửa bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa dung dịch và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Các lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không.* Phần cặn được hòa tan trong DCM (5 mL) và vài giọt MeOH, tiếp theo, hexan được bổ sung vào chất kết tủa từ sản phẩm. Chất kết tủa được lọc để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (410 mg, 72%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 542,4/544,4 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 220

1-Bromo-1,2,2-triđoteri-etylen

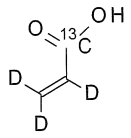


1,2-Dibromoetan-d_4 (25,0 g, 130,28 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch chứa kali hydroxit (15,19 g, 243,63 mmol) trong 95% etanol-OD (95 mL) và D_2O (5 mL) ở 33 °C. Hỗn hợp này được khuấy đầu tiên ở 60 °C trong 1,5 giờ, và tiếp theo, ở 63 °C trong 1,5 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu không màu,

mà nó được cất liên tục từ hỗn hợp phản ứng trong quá trình đun nóng và gom trong bình phản ứng thu được được làm mát trong bể nước đá-axeton khô (7,3 g, 50%).

Ví dụ điều chế 221

2,3,3-Triđoteriprop-2-enoic axit–^{13}C

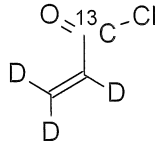


Sợi magie (1,67 g, 69,71 mmol), tinh thể iot, và THF khan (20 mL) được cho vào bình phản ứng. Trong khi đó dung dịch chứa 1-bromo-1,2,2-triđoteri-etylen (7,3 g, 66,39 mmol) trong THF khan (30 mL) được điều chế. Hỗn hợp chứa magie này được đun nóng đến 50 °C và một phần dung dịch vinyl bromua (2 mL) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được đun nóng ở 50 °C cho đến khi phản ứng Grignard được bắt đầu và hỗn hợp này bắt đầu hồi lưu (65 °C). Dung dịch vinyl bromua còn lại trong THF được bổ sung nhỏ giọt vào ở nhiệt độ 55 đến 65 °C trong 1,5 giờ. Hỗn hợp thu được được đun nóng ở 65 °C trong 1,5 giờ để đảm bảo rằng hỗn hợp này phản ứng hoàn toàn. Dung dịch (1,2,2-triđoterivinyl)magie bromua trong THF mới được điều chế được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và được sử dụng ngay lập tức.

Khí cacbon dioxit-^{13}C được cho sục qua THF khan (50 mL) ở -65 °C trong 5 phút. Dung dịch (1,2,2-triđoterivinyl)magie bromua mới được điều chế trong THF (66,39 mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào ở nhiệt độ tại đó nhiệt độ hỗn hợp phản ứng tăng lên -20 °C. Hỗn hợp này được làm ấm đến -10 °C và được khuấy trong 10 phút. Khí cacbon dioxit-^{13}C được cho sục qua hỗn hợp này trong 2 phút nữa. Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được khuấy trong 10 phút. Hydroquinon (10 mg) được bổ sung vào, tiếp theo là bổ sung nhỏ giọt dung dịch axit sulfuric 6M (6,5 mL) để tôi hỗn hợp phản ứng trong khi duy trì nhiệt độ nhỏ hơn 20 °C. Hỗn hợp này được pha loãng với dietyl ete (400 mL) và natri sulfat (100 g) được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 5 phút, lọc, và cô *trong chân không ở* 0 đến 5 °C để tạo ra sản phẩm thô (7,5 g) dưới dạng dầu màu vàng. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách chưng cất chân không ngắn để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng dầu không màu (1,2 g, 24%).

Ví dụ điều chế 222

Clorua–^{13}C của axit 2,3,3-Triđơteriprop-2-enoic

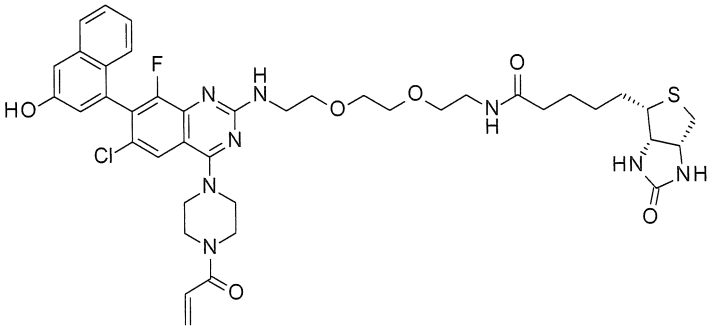


Oxalyl clorua (0,24 mL, 2,85 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa 2,3,3-triđơteriprop-2-enoic axit–^{13}C (0,181 g, 2,38 mmol) và DMF (1 drop) trong DCM khan (10 mL) ở 0 °C và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hợp chất nêu ở đề mục này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp theo dưới dạng dung dịch.

Ví dụ điều chế 223

Mẫu dò Kras

N-(2-{2-[2-({6-clo-8-flo-7-(3-hydroxynaphtalen-1-yl)-4-[4-(prop-2-enoyl)piperazin-1-yl]quinazolin-2-yl}amino)etoxy]etoxy}etyl)-5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]pentanamit



Bước A: *tert*-Butyl 4-(7-bromo-2,6-diclo-8-floquinazolin-4-yl)piperazin-1-carboxylat (0,51 g, 1,1 mmol) và IPA (5 mL) được gom trong bình phản ứng vi sóng. DIPEA (0,55 mL, 3,3 mmol) và 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]-N-[2-[2-(2-aminoetoxy)etoxy]etyl]pentanamit (0,48 g, 1,32 mmol) được bổ sung và hỗn hợp này được đun nóng đến 120 °C trong lò phản ứng vi sóng trong sáu giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp này được pha loãng với dung dịch nước amoni clorua bão hòa dung dịch và 25% IPA trong $CHCl_3$ và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên khan

natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký pha thông thường, rửa giải bằng 50-100% B trong gradient (A: hexan, B: 10% MeOH trong DCM), để tạo ra the *tert*-butyl 4-{7-bromo-6-clo-8-flo-2-[(2-{2-[2-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]pentanoyl}amino) etoxy]etoxy}etyl)amino]quinazolin-4-yl}piperazin-1-carboxylat dưới dạng chất rắn màu vàng (0,68 g, 78%). ES/MS m/z: 819 (M+H).

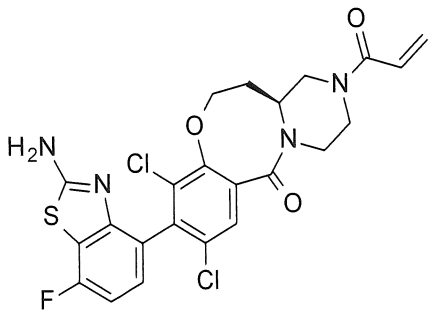
Bước B: *tert*-Butyl 4-{7-bromo-6-clo-8-flo-2-[(2-{2-[2-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]pentanoyl}amino)etoxy] etoxy}etyl)amino]quinazolin-4-yl}piperazin-1-carboxylat (0,30 g, 0,37 mmol), 1,4-dioxan (4 mL) và nước (0,75 mL) được gom. Kali cacbonat (0,24 g, 1,11 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphtalen-2-ol (0,20 g, 0,74 mmol), và tetrakis(triphenylphosphin) paladi(0) (0,085 g, 0,074 mmol) được bổ sung và hỗn hợp này được khuấy ở 85 °C trong môi trường nitơ trong 12 giờ. Sau thời gian này, hỗn hợp này được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và lọc để loại bỏ chất rắn. Dịch lọc được pha loãng với dung dịch nước amoni clorua bão hòa dung dịch và EtOAc và các lớp được tách riêng. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên khan natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký pha thông thường, rửa giải bằng 90-100% B trong gradient (A: hexan, B: 10% MeOH trong DCM), để tạo ra *tert*-butyl 4-{6-clo-8-flo-7-(3-hydroxynaphtalen-1-yl)-2-[(2-{2-[2-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]pentanoyl}amino)etoxy]etoxy}etyl)amino]quinazolin-4-yl}piperazin-1-carboxylat dưới dạng chất rắn màu vàng (0,31 g, 96%). ES/MS m/z: 881 (M+H).

Bước C: Dung dịch chứa *tert*-butyl 4-{6-clo-8-flo-7-(3-hydroxynaphtalen-1-yl)-2-[(2-{2-[2-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]pentanoyl}amino)etoxy]etoxy}etyl)amino]quinazolin-4-yl}piperazin-1-carboxylat (0,31 g, 0,35 mmol) trong MeOH (4 mL) được làm nguội xuống 0 °C. HCl (3 M trong MeOH, 6 mL, 17,5 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 0 °C trong 30 phút trước khi để ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau ~18 giờ, hỗn hợp phản ứng này được cô *trong chân không*. Phần cặn được pha loãng với DCM và cô *trong chân không* một lần nữa. Phần cặn thu được được pha loãng với hexan và được

khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong hai giờ. Chất rắn thu được được lọc và làm khô trong chân không để tạo ra N-{2-[2-(2-{[6-clo-8-flo-7-(3-hydroxynaphtalen-1-yl)-4-(piperazin-1-yl)quinazolin-2-yl]amino}etoxy)etoxy]etyl}-5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]enzoxaze-4-yl]pentanamit hydro clorua. Muối hydroclorua này (0,19 g, 0,23 mmol) được trung hòa bằng cách kết hợp với DIEA (0,16 mL, 0,92 mmol) trong DCM (2,5 mL). Hỗn hợp này được làm nguội xuống -78 °C và acryloyl clorua (0,5 M trong DCM, 0,4 mL, 0,21 mmol) được bổ sung vào. Sau 30 phút, hỗn hợp này được để ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau một giờ, hỗn hợp này được pha loãng với MeOH (1 mL) và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký pha đảo, rửa giải bằng 35-60% B trong gradient (A: 10 mM dung dịch nước NH_4HCO_3 với MeOH 5%; B: ACN), để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (0,027 g, 14%). ES/MS m/z: 835 (M+H).

Ví dụ 1

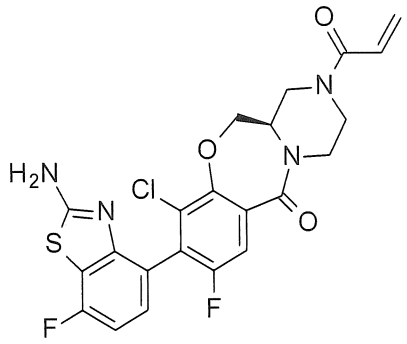
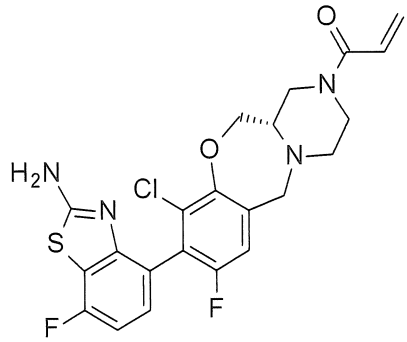
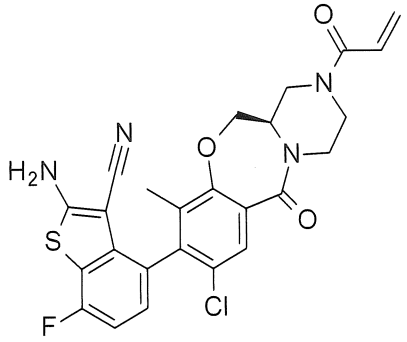
(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on

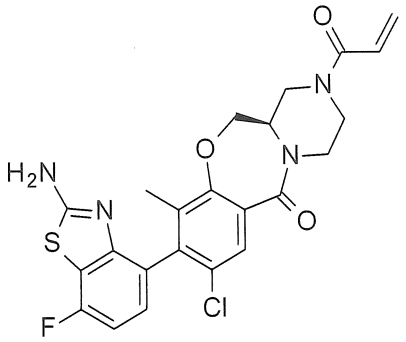
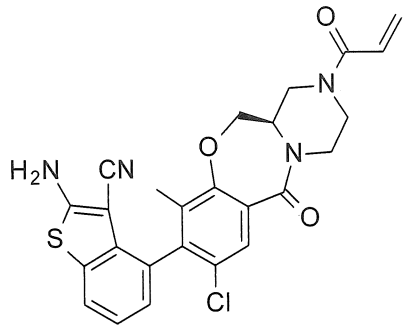
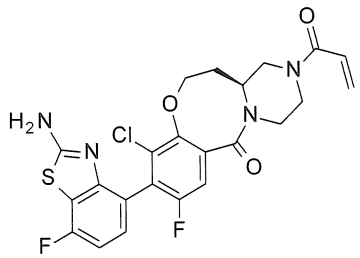


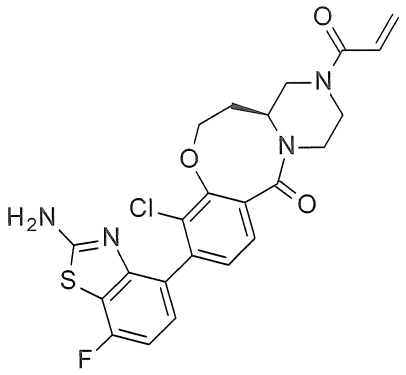
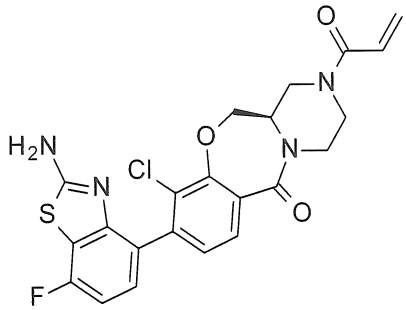
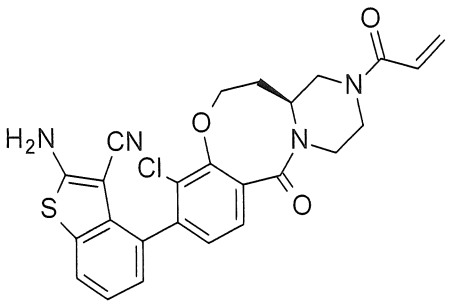
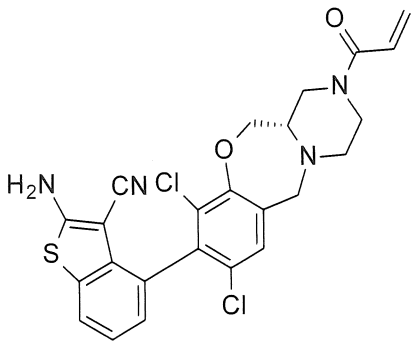
(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on (500 mg, 1,070 mmol) được hòa tan trong DCM (5 mL) và TEA (0,75 mL, 5,4 mmol). Hỗn hợp này được làm nguội xuống -78 °C và tiếp theo, acryloyl clorua (0,085 mL, 1,0 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở -78 °C. Sau 5 phút, vài giọt rượu isopropylic được bổ sung ở -78 °C và tiếp theo, hỗn hợp này được cô *trong chân không* và cho vào sắc ký pha đảo để tạo ra hỗn hợp gồm hai chất đồng phân atropi. Hỗn hợp gồm các chất đồng phân atropi này được tách riêng bằng cách sử dụng Chiralpak® IC, 4,6 x 150

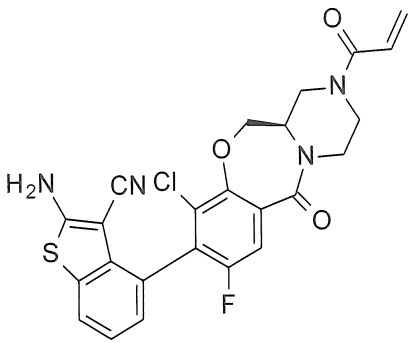
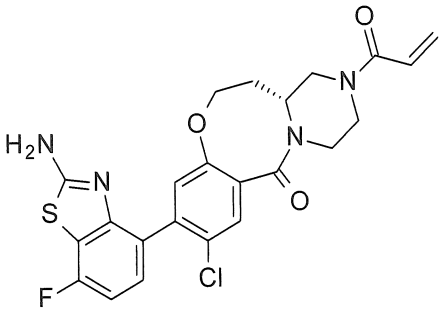
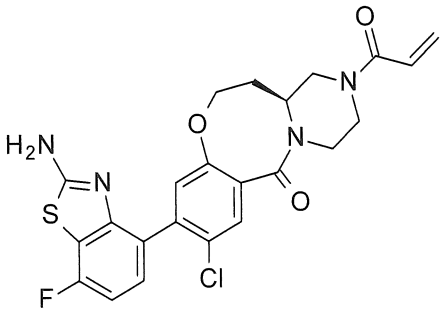
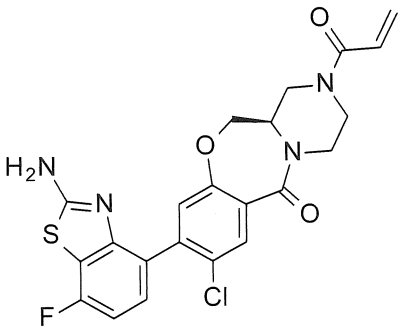
mm, 40% EtOH/CO_2, 5 mL/phút, 225 nm. Hợp chất thứ hai của cột được xác định là chất đồng phân atropi hoạt động (165 mg, 55%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 521/523 $[M+H]^+$ (>98% lượng dư chất đồng phân đối ảnh). Chất đồng phân atropi kém hoạt động hợp chất thứ nhất của cột (133 mg, 44%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 521/523 $[M+H]^+$ (>98% lượng dư chất đồng phân đối ảnh).

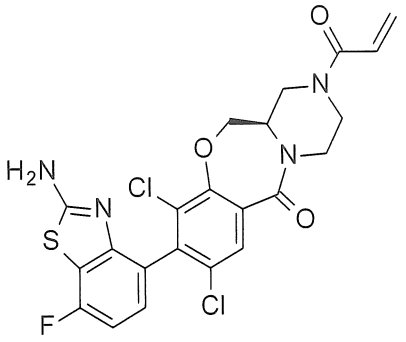
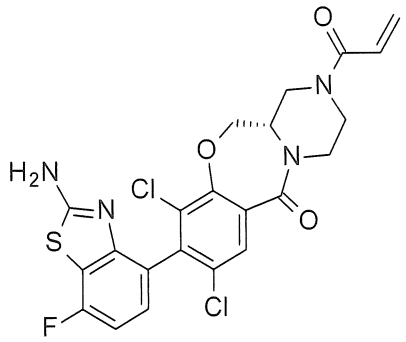
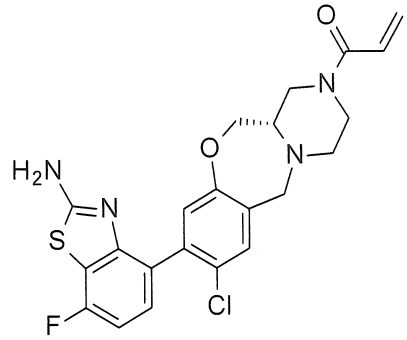
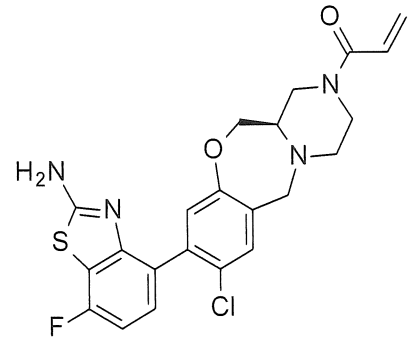
Bảng 21: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ 1

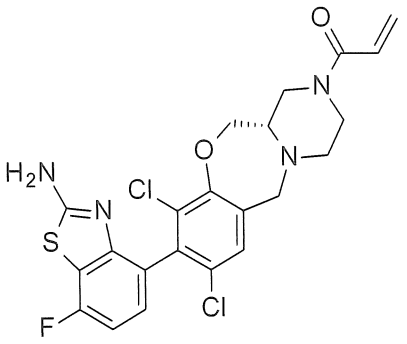
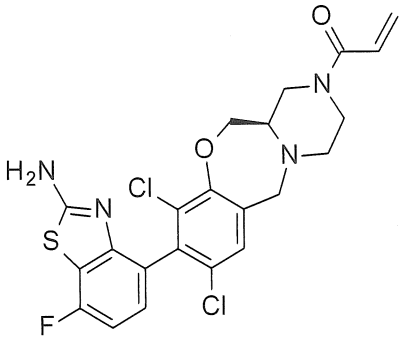
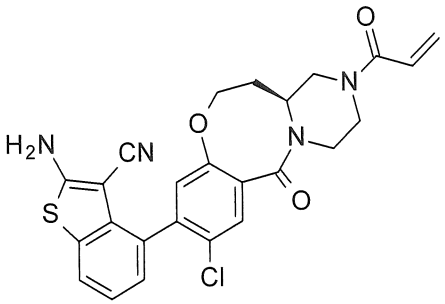
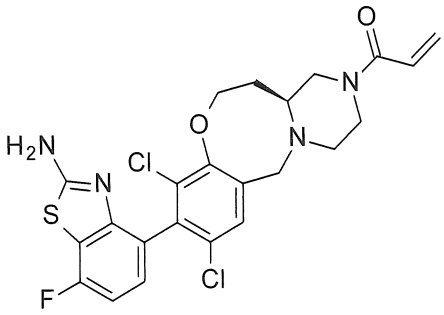
Ví dụ	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
2		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7-clo-9-flo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	491,2/493,2
3		1-[(4aS)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7-clo-9-flo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	477,2/479,2
4		4-[(4aR)-9-clo-7-metyl-11-oxo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-7-flo-	511,0/513,0

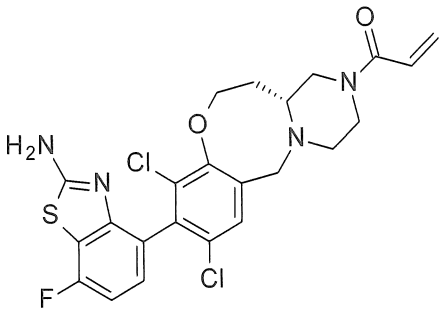
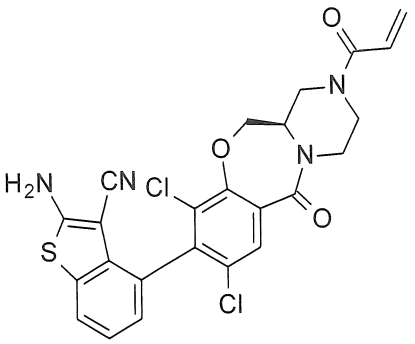
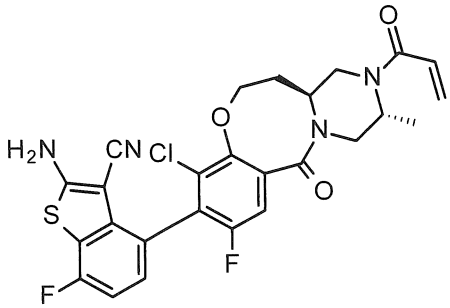
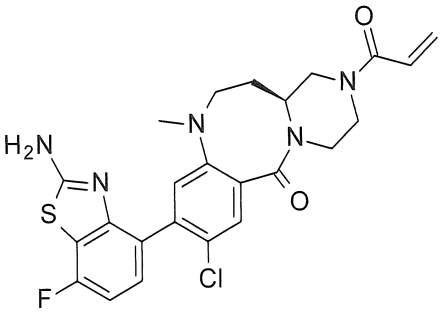
		benzothiophen-3-cacbonitril	
5		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-7-metyl-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	487,0/489,0
6		(4aR)-8-(2-Amino-3-metyl-benzothiophen-4-yl)-7-clo-9-metyl-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	493,0/495,0
7		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-10-clo-8-flo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	505,2/507,2

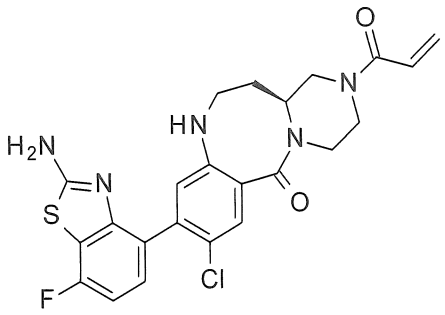
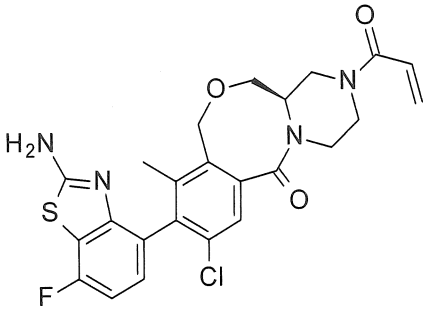
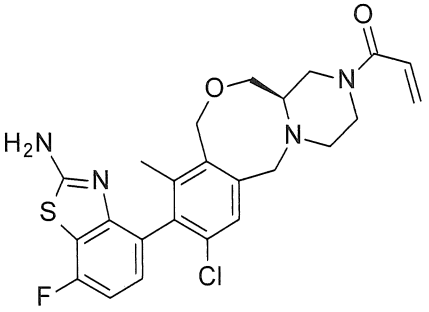
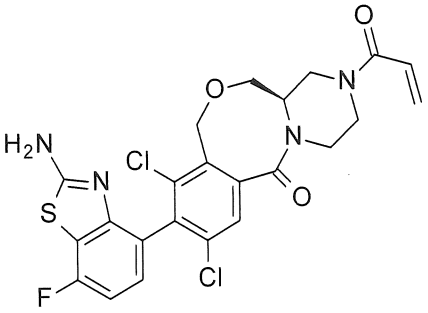
8		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-10-clo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	487,0/489,0
9		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7-clo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	473,0/475,0
10		4-[(13aS)-10-clo-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	493,0/495,0
11		4-[(4aS)-7,9-Diclo-3-prop-2-enoyl-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	499,2/501,2

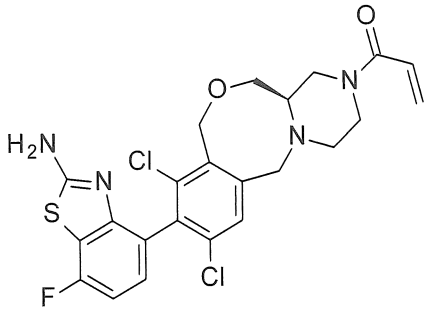
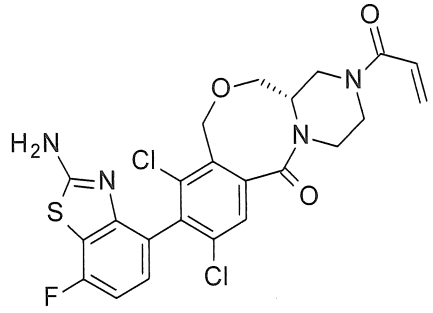
12		4-[(4aR)-7-clo-9-flo-11-oxo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	497,2/499,2
13		(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	487,0/489,0
14		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	487,0/489,0
15		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	473,0/475,0

16		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	507,0/509,0
17		(4aS)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	506,9/508,8
18		1-[(4aS)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	459,0/461,0
19		1-[(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	459,0/461,0

20		1-[(4aS)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	493,0/495,0
21		1-[(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	493,0/495,0
22		4-[(13aS)-8-clo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	493,0/495,0
23		1-[(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-yl]prop-2-en-1-on	507,0/509,0

24		1-[(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-3,4,6,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-yl]prop-2-en-1-on	507,0/509,0
25		4-[(4aR)-7,9-Diclo-11-oxo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	513,0/515,0
26		4-[(3R,13aS)-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	543,0/545,0
27		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-11-metyl-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-on	500,0/502,0

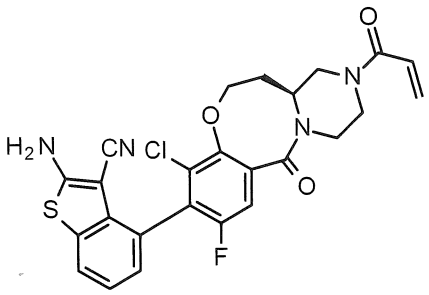
28		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-2-prop-2-enoyl-3,4,11,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzodiazocin-6-on	486,0/488,0
29		(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-10-metyl-2-prop-2-enoyl-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-6-on	501,0/503,0
30		1-[(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-10-metyl-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-yl]prop-2-en-1-on	487,0/489,0
31		(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-6-on	521,2/523,2

32		1-[(13aR)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-3,4,6,11,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-2-yl]prop-2-en-1-on	507,0/509,0
33		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8,10-diclo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,11,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][2,5]benzoxazoxin-6-on	521,0/523,0

Trong một số trường hợp, DIEA được sử dụng thay cho TEA.

Ví dụ 34

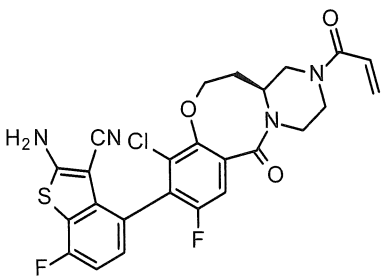
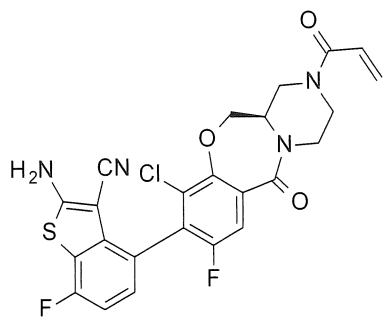
4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril

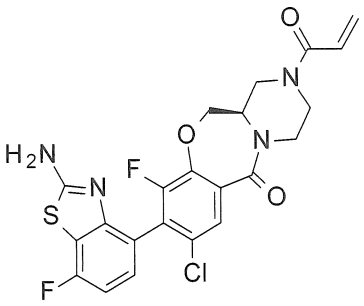
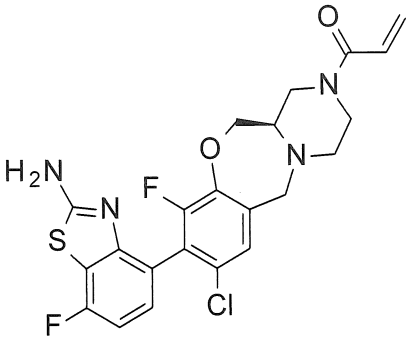
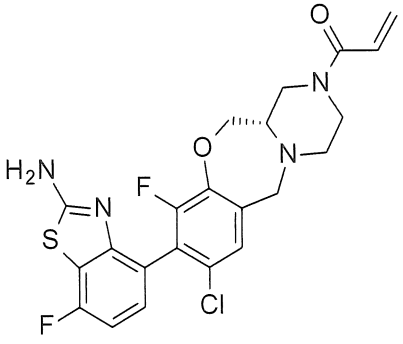


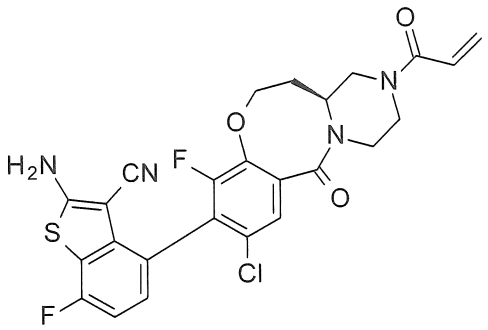
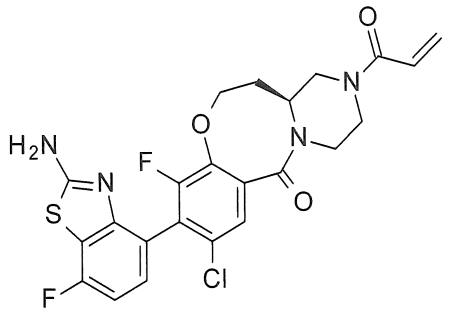
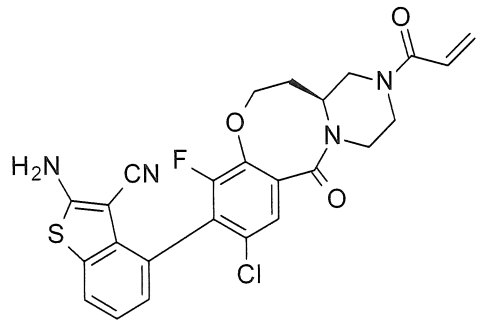
Huyền phù chứa 4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril (1,58 g, 3,46 mmol) trong EtOAc (35 mL), THF (15 mL) và nước (40 mL) được nạp kali cacbonat (1,90 g, 13,7 mmol). Hỗn hợp này được khuấy nhanh và được làm mát xuống 0 °C. Acryloyl clorua trong DCM (13,0 mL, 3,25 mmol, 0,25M) được bổ sung nhỏ

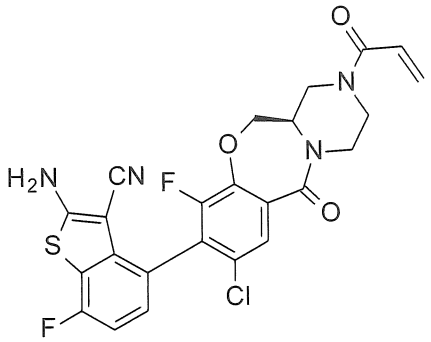
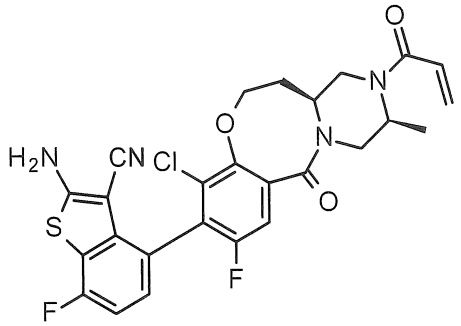
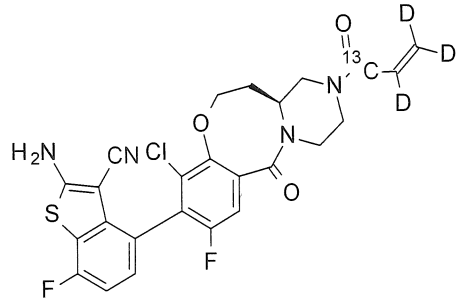
giọt vào qua phễu nhỏ giọt. Sau 10 phút khuấy trong bể đá, hỗn hợp này được pha loãng với EtOAc và rót vào phễu tách. Các lớp được tách riêng và lớp nước là chiết lại bằng EtOAc. Dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh silicagel, rửa giải lần đầu bằng 0-100% (10% MeOH trong DCM)/DCM, và lần thứ hai bằng 0-100% [10% (NH_3 7N trong MeOH) trong DCM]/DCM để tạo ra sản phẩm mong muốn dưới dạng chất rắn mềm mịn. Chất rắn này được siêu âm trong ete trong 30 phút, lọc, và sấy khô trong chân không cao để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (1,60 g, 91%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 511,0/513,0 $[M+H]^+$.

Bảng 22: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ 34

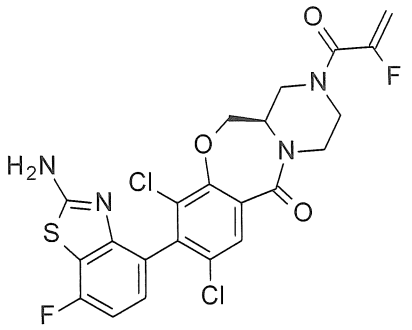
Ví dụ	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
35		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	529,0/531,0
36		4-[(4aR)-7-clo-9-flo-11-oxo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-7-flo-	515,0/517,0

		benzothiophen-3-cacbonitril	
37		(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-7-flo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on	491,0/493,0
38		1-[(4aR)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-7-flo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	477,0/479,0
39		1-[(4aS)-8-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-9-clo-7-flo-1,2,4,4a,5,11-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-3-yl]prop-2-en-1-on	477,0/479,0

40		4-[(13aS)-8-clo-10-flo-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	529,0/531,0
41		(13aS)-9-(2-Amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-8-clo-10-flo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-6-on	505,0/507,0
42		4-[(13aS)-8-clo-10-flo-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-benzothiophen-3-cacbonitril	511,0/513,0

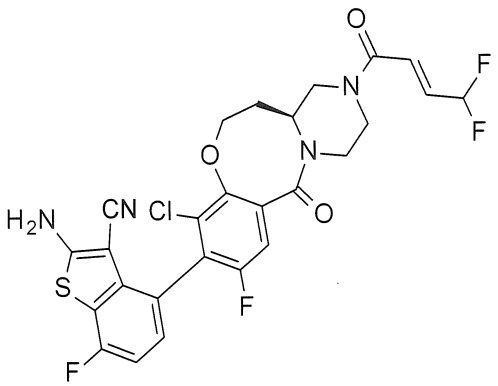
43		4-[(4aR)-9-clo-7-flo-11-oxo-3-prop-2-enoyl-2,4,4a,5-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-8-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	515,0/517,0
44		4-[(3S,13aS)-10-clo-8-flo-3-metyl-6-oxo-2-prop-2-enoyl-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	542,4/544,4
45		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2-(2,3,3-triđoteriprop-2-enoyl)-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril-^{13}C	533,1/535,1

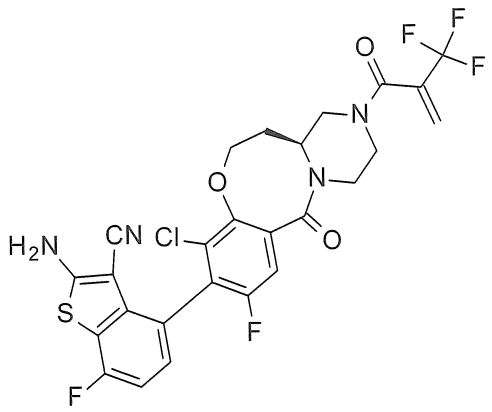
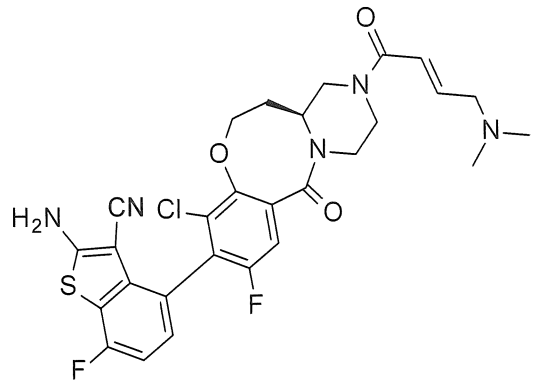
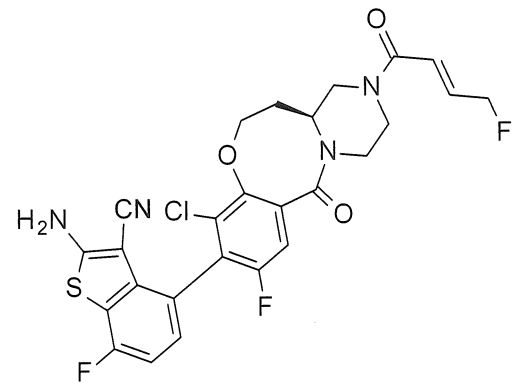
Ví dụ 46

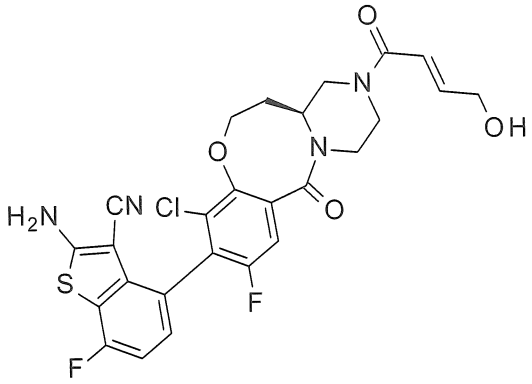
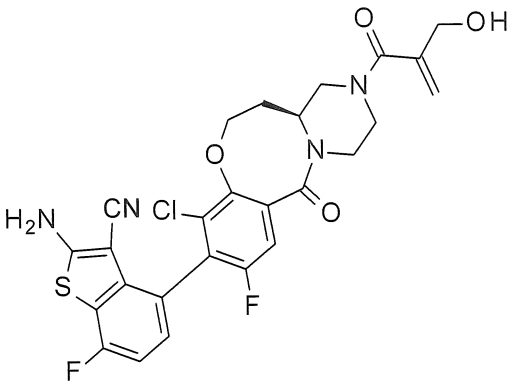
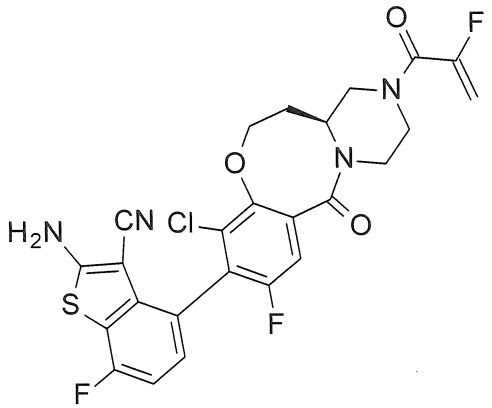


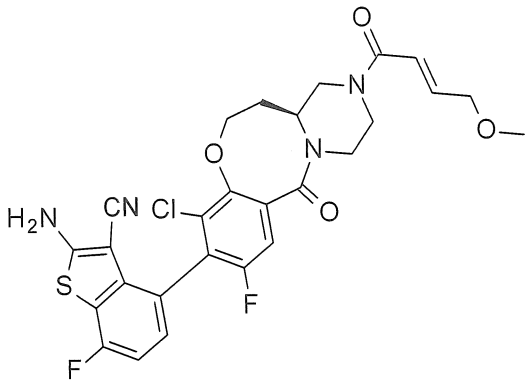
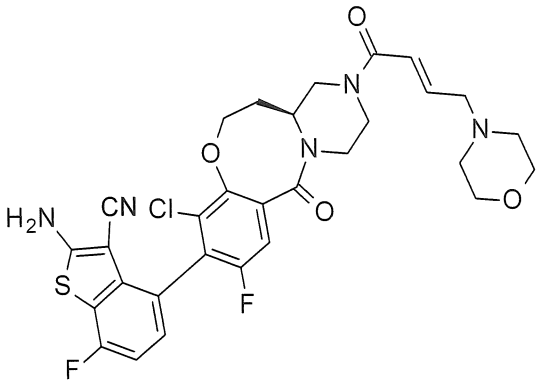
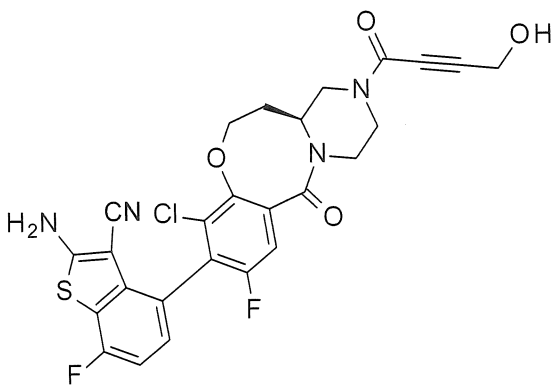
Dung dịch (4aR)-8-(2-amino-7-flo-1,3-benzothiazol-4-yl)-7,9-diclo-1,2,3,4,4a,5-hexahydropyrazino[2,1-c][1,4]benzoxazepin-11-on (46 mg, 0,10 mmol), axit 2-floprop-2-enoic (11 mg, 0,12 mmol), DIEA (53 µL, 0,30 mmol) trong DMF (1 mL) được làm mát trong bể nước đá ở 0 °C được bổ sung dung dịch propylphosphonic anhydrit 50% khối lượng trong EtOAc (91 µL, 0,15 mmol). Sau 45 phút, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng sắc ký pha đảo, rửa giải bằng 20-80% B trong gradient (A: 10 mM dung dịch nước NH_4HCO_3 với MeOH 5%; B: ACN), để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (25 mg, 47%). ES/MS m/z: 525 (M+H)

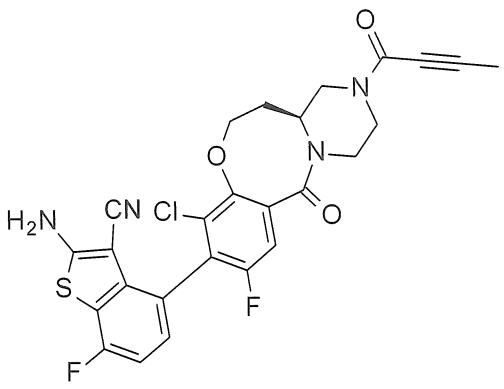
Bảng 23: Các hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ 46

Ví dụ	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M + H)
47		4-[(13aS)-10-clo-2-[(E)-4,4-diflobut-2-enoyl]-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	579,5/581,4

48		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2-[2-(triflometyl)prop-2-enoyl]-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	597,5/599,5
49		4-[(13aS)-10-clo-2-[(E)-4-(dimetylamino)but-2-enoyl]-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	586,6/588,6
50		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-[(E)-4-flobut-2-enoyl]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	561,5/563,5

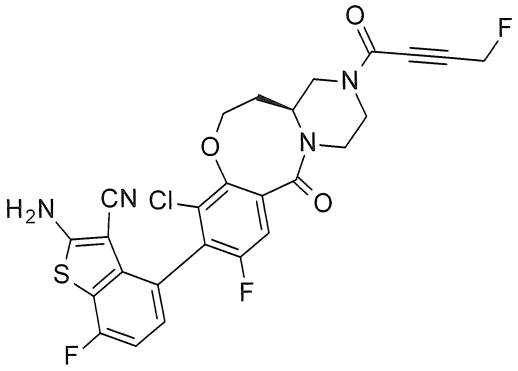
51		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-[(E)-4-hydroxybut-2-enoyl]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	559,4/561,4
52		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-[2-(hydroxymetyl)prop-2-enoyl]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	559,4/561,4
53		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-(2-floprop-2-enoyl)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	547,0/549,0

54		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-[(E)-4-metoxybut-2-enoyl]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	573,6/575,6
55		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-[(E)-4-morpholinobut-2-enoyl]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	628,6/630,6
56		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-(4-hydroxybut-2-ynoyl)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	557,5/559,4

57		4-[(13aS)-2-But-2-ynoyl-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	541,4/543,4

Ví dụ 58

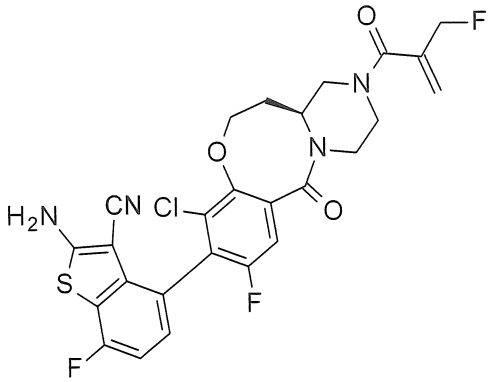
4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-(4-flobut-2-ynoyl)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril



Dietylaminosulfur triflorua (0,03 mL, 0,2 mmol) được bổ sung nhỏ giọt bằng xyranh vào ống được bịt kín chứa dung dịch chứa 4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-(4-hydroxybut-2-ynoyl)-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril (120 mg, 0,215 mmol) trong DCE (2 mL) ở 0 °C. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong 30 phút và tiếp theo, pha loãng với nước và dung dịch 25% IPA/clorofom. Các lớp hữu cơ được tách riêng, làm khô trên khan natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 0-100% 10% NH_3 7M trong DCM/DCM và tinh chế thêm bằng sắc ký pha đảo để tạo ra

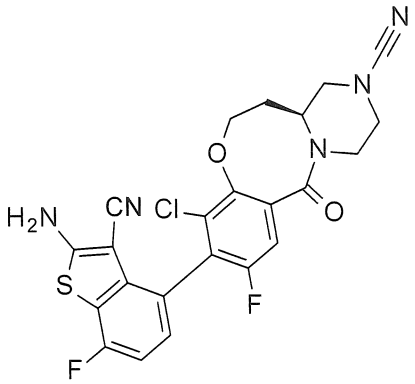
hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (7 mg, 6%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 559,4/561,4 $[M+H]^+$.

Bảng 24: Hợp chất được tổng hợp theo cách gần như tương tự với cách của Ví dụ 57

Ví dụ	Cấu trúc	Tên hợp chất	ES/MS m/z (M+H)
59		4-[(13aS)-10-clo-8-flo-2-[2-(flometyl)prop-2-enoyl]-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril	561,4/563,5

Ví dụ 60

(13aS)-9-(2-Amino-3-xyano-7-flo-benzothiophen-4-yl)-10-clo-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-2-cacbonitril

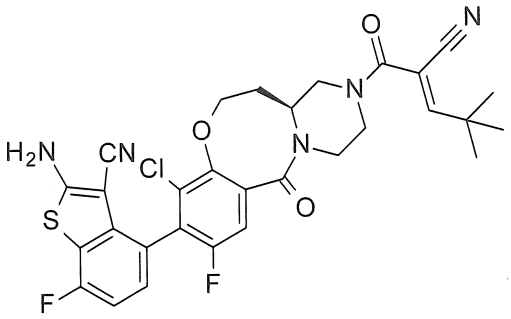


Xyanogen bromua (3M trong DCM, 0,15 mL, 0,45 mmol) được bổ sung vào bình phản ứng chứa 4-[(13aS)-10-clo-8-flo-6-oxo-2,3,4,12,13,13a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril (100 mg, 0,211 mmol) và 1N NaOH (1 mL) trong DCM (1 mL). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 18 giờ tiếp theo, pha loãng với nước

và dung dịch 25% IPA/clorofom. Các lớp hữu cơ được tách riêng, làm khô trên khan natri sulfat, lọc, và cô *trong chân không*. Phần cặn thu được bằng sắc ký pha đảo để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu trắng (29 mg, 27%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 517,0/519,0 $[M+H]^+$.

Ví dụ 61

4-[(13aS)-10-clo-2-[(E)-2-xyano-4,4-dimetyl-pent-2-enoyl]-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril



Ống vi sóng 20 ml được nạp 4-[(13aS)-10-clo-2-(2-xyanoaxetyl)-8-flo-6-oxo-1,3,4,12,13,13a-hexahydropyrazino[2,1-d][1,5]benzoxazoxin-9-yl]-2-amino-7-flo-benzothiophen-3-cacbonitril (0,410 g, 0,756 mmol), EtOH (8 mL), piperidin (0,15 mL, 1,5 mmol) và trimetylaxetaldehyt (0,7 mL, 6 mmol) và được bịt kín bằng mũ vách ngăn. Hỗn hợp phản ứng này được đun nóng trong lò phản ứng vi sóng ở 120 °C trong 60 phút, 90 phút nữa ở 120 °C, và 1 giờ nữa ở 100 °C trước khi cô *trong chân không*. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh silicagel rửa giải bằng 0-50% axeton : DCM để tạo ra sản phẩm nêu ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhợt (117 mg, 25%). ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 610,6/612,6 $[M+H]^+$.

Thử nghiệm sinh học

Các thử nghiệm sau chứng minh rằng các hợp chất làm ví dụ là chất ức chế KRas G12C và ức chế sự phát triển của các khối u nhất định *in vitro* và/hoặc *in vivo*.

Thử nghiệm TR-FRET tỷ lệ chiếm dụng mẫu dò KRas G12C

Mục đích của thử nghiệm này để đo khả năng của chất ức chế cạnh tranh với mẫu dò để gắn kết với và cải biến cộng hóa trị KRas G12C ở codon 12. Tín hiệu được

tạo ra bởi sự chuyển giao huỳnh quang được phân giải theo thời gian giữa europi trên kháng thể liên kết với KRas G12C Kháng thể kháng Histidin đánh dấu europi LanthaScreen (kháng thể Eu kháng His) và chất đánh dấu huỳnh quang 647 (Alexa Fluor™) liên kết với KRas G12C thông qua streptavidin và chất ức chế biotinyl hóa ("mẫu dò KRas", xem Ví dụ điều chế 223).

Các chất ức chế được thử nghiệm ở định dạng đáp ứng liều từ dung dịch gốc 10 mM trong DMSO 100%. Labycyte Echo® 555 được sử dụng để pha loãng và chuyển 100 nL mỗi giếng chứa dung dịch pha loãng theo dãy 10 điểm, gấp 2,8 lần vào đĩa thử nghiệm. Hai bản sao của đĩa xét nghiệm được chuẩn bị để đo hiệu lực sau khi ủ chất ức chế 5 và 60 phút với KRas G12C. KRas G12C (20 nM) được gắn thẻ His được thêm vào các đĩa trong dung dịch đệm thử nghiệm (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,01% TX-100 và 1 mM DTT). Sau khi ủ 5 hoặc 60 phút, 1 µM mẫu dò KRas được thêm vào và để cho cải biến cộng hóa trị KRas G12C tự do trong 1 giờ. Chất này được pha loãng 4 lần trong dung dịch đệm chứa kháng thể Eu kháng His và chất đánh dấu được bao streptavidin 647 (cả hai đều từ Life Technologies) để đạt được KRas G12C (5 nM), kháng thể kháng His (2 nM), mẫu dò KRas (300 nM) và chất đánh dấu được bao streptavidin 647 (500 nM). Sau 30 phút, tín hiệu huỳnh quang được đọc trên đầu đọc đĩa Envision™ (kích thích ở 340 nM, phát xạ dấu vết (em) ở 665 nM và phát xạ kháng thể ở 615 nM). Giếng kiểm soát tối đa không có chất ức chế và giếng kiểm soát tối thiểu không có cả chất ức chế và KRas G12C. Tỷ lệ tín hiệu (em at 665/em at 615) được chuyển thành mức ức chế theo phần trăm theo công thức sau: Mức ức chế theo % = 100 – [(Tín hiệu Hợp chất thử nghiệm – Tín hiệu Tối thiểu trung bình)/(Tín hiệu Tối đa trung bình – Tín hiệu Tối thiểu trung bình) x 100]. IC_{50} được xác định bằng cách điều chỉnh mức ức chế theo phần trăm ở mỗi nồng độ chất ức chế vào phương trình phương trình logistic phi tuyến bốn tham số sử dụng Genedata Screene®: y = (A+((B-A)/(1 + ((C/x)^D)))) trong đó, y = % ức chế, A = tối thiểu đường tiệm cận, B = tối đa đường tiệm cận, C=IC_{50} tương đối hoặc nồng độ chất ức chế tạo ra tạo ra sự ức chế 50% trong phạm vi phù hợp của cả hai loại đường tiệm cận, và D = sườn đồi. Hợp chất trong phạm vi sáng chế được đánh giá trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Các hợp chất ví dụ theo sáng chế được đánh giá trong thử nghiệm này thể hiện hoạt tính của chất ức chế KRas G12C bằng cách cạnh tranh với

một đầu dò để liên kết và biến đổi cộng hóa trị KRas G12C tại codon 12. Ví dụ, hợp chất của Ví dụ 1 được đánh giá trong thử nghiệm này có IC_{50} nhỏ hơn 0,015 µM, ở 5 và 60 phút, n = 4.

Phospho-ERK tế bào H358 AlphaLISA®

Mục đích của thử nghiệm này được để đo khả năng của các hợp chất thử nghiệm trong việc ức chế sự phosphoryl hóa p-ERK1/2, một tác nhân xuôi dòng của KRas trong tế bào ung thư phổi H358 (ATCC CRL-5807) của người. Một cách ngắn gọn, thử nghiệm AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) là một phương pháp xét nghiệm miễn dịch bánh mì kẹp để phát hiện định lượng phospho-ERK 1/2 (được phosphoryl hóa trên Thr202/Tyr204 trong ERK1, hoặc Thr185/Tyr187 trong ERK2) trong dịch ly giải tế bào bằng cách sử dụng Công nghệ Alpha (Perkin Elmer Cat # ALSU-PERK-A50K).

Tế bào H358 được dàn mỏng ở 40K tế bào mỗi giếng trong môi trường 100 µL (RPMI 1640, GIBCO Cat # 22400-071) chứa 10% FBS (GIBCO Cat#: 10082-147) trong đĩa 96 giếng (Costar #3596) và được ủ qua đêm trong khay giữ ẩm ở 37 °C, 5% CO_2. Buổi sáng tiếp theo, 10 µL các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy (3 lần) (nồng độ đỉnh 50 µM) và 10 µL chất đối chứng (giếng tín hiệu tối đa: 5% DMSO và giếng tín hiệu tối thiểu: 2 µM N-(3-{3-xyclopropyl-5-[(2-flo-4-iodophenyl)amino]-6,8-dimetyl-2,4,7-trioxo-3,4,6,7-tetrahydropyrido[4,3-D]pyrimidin-1(2H)-yl}phenyl)axetamit (trametinib, làm chất đối chứng dương) được bổ sung vào đĩa tế bào và được ủ trong 2 giờ trong khay giữ ẩm ở 37 °C/5% CO_2. Dung dịch đệm phân giải được điều chế ở nhiệt độ môi trường xung quanh chứa hỗn hợp chất ức chế proteaza và phosphataza. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ bằng cách lộn ngược và lắc đĩa tế bào trong bồn rửa và tiếp theo, thấm lên khăn giấy. Dung dịch đệm phân giải được bổ sung vào đĩa tế bào (50 µL mỗi giếng) và đĩa này được ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 10 phút trên thiết bị lắc. Để phát hiện p-ERK, giọt chất nhận được pha loãng vào hỗn hợp huyền phù với dung dịch đệm. Bằng cách sử dụng thiết bị xử lý chất lỏng STARlet, 5 µL giọt chất nhận và 2 µL dịch phân giải tế bào được chuyển dưới dạng chất pha loãng tại đỉnh một bước vào đĩa thử nghiệm 384 giếng. Đĩa thử nghiệm được bịt kín bằng lá kim loại và ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 2 giờ. Giọt chất cho được pha loãng vào hỗn hợp huyền phù với dung dịch đệm. Bằng

cách sử dụng thiết bị STARlet, 5 µL giọt chất cho được bổ sung vào đĩa thử nghiệm mà tiếp theo, bịt kín, bọc bằng lá kim loại. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 2 giờ trong bóng tối. Tiếp theo, đĩa thử nghiệm được đọc trên đầu đọc đĩa EnVision™ (Perkin Elmer) bằng cách sử dụng chương trình huỳnh quang.

Tín hiệu được chuyển hóa thành phần trăm ức chế bằng cách sử dụng phương trình sau:

% Ức chế = 100 – [(Tín hiệu Hợp chất thử nghiệm – Tín hiệu tối thiểu trung bình)/(Tín hiệu tối đa trung bình – Tín hiệu tối thiểu trung bình) x 100]. Tín hiệu tối đa là giếng đối chứng không có chất ức chế. Tín hiệu tối thiểu là giếng đối chứng chứa chất ức chế tham khảo đủ để ức chế hoàn toàn hoạt tính. IC_{50} được xác định bằng cách điều chỉnh mức ức chế theo phần trăm ở mỗi nồng độ chất ức chế vào phương trình phương trình logistic phi tuyến bốn tham số sử dụng Genedata Screene®: y = (A+((B-A)/(1 + ((C/x)^D)))) trong đó, y = % ức chế, A = đường tiệm cận tối thiểu, B = đường tiệm cận tối đa, C = IC_{50} tương đối hoặc nồng độ chất ức chế tạo ra sự ức chế 50% trong khoảng hiệu chỉnh của cả hai đường tiệm cận, và D = sườn đồi.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được đánh giá trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Các hợp chất của các Ví dụ thể hiện khả năng ức chế việc phosphoryl hóa p-ERK1/2. Hợp chất của Ví dụ 1, ví dụ, thể hiện IC_{50} tương đối trong thử nghiệm này là 0,00178 µM n =3. Dữ liệu này cho thấy rằng các hợp chất của các Ví dụ thể hiện hoạt tính ức chế KRas G12C trong thử nghiệm tế bào này.

Hoạt tính RAS GTPaza ELISA trên tế bào H358

Mục đích của thử nghiệm này được để đo khả năng của các hợp chất thử nghiệm trong việc ức chế hoạt tính RAS GTPaza cơ định ở tế bào ung thư phổi của người H358 (ATCC CRL-5807). Kit RAS GTPaza ELISA (Active Motif Cat# 52097) chứa đĩa 96 giếng được phủ sơ bộ bằng glutathion để giữ protein GST-Raf-RBD được cung cấp bởi kit. RAS hoạt động (gắn vào GTP) trong dịch chiết tế bào gắn kết đặc hiệu với Raf-RBD. RAS gắn kết được phát hiện bằng kháng thể sơ cấp có khả năng nhận ra Kras của người. Kháng thể thứ cấp tiếp hợp với HRP nhận ra kháng thể sơ cấp và dung dịch phát triển cung cấp thông tin quang hóa.

Các tế bào H358 được dàn mỏng với mật độ 80.000 tế bào/giếng trong 90 µL môi trường không chứa huyết thanh (RPMI 1640, GIBCO) và được ủ qua đêm ở 37 °C/5% CO_2. Buổi sáng tiếp theo, 10 µL các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy (3 lần) (nồng độ đỉnh 500 µM) và 10 µL chất đối chứng (giếng tín hiệu tối đa: 5 % DMSO và giếng tín hiệu tối thiểu: 500 µM 1-[4-[6-clo-8-flo-7-(3-hydroxy-1-naphthyl)quinazolin-4-yl]piperazin-1-yl]prop-2-en-1-on, WO2015054572 làm chất ức chế) được bổ sung vào đĩa tế bào và được ủ trong 2 giờ ở 37 °C/5 % CO_2. Dung dịch đệm gắn kết/phân giải hoàn toàn được điều chế chứa hỗn hợp chất ức chế proteaza và GST-Raf-RBD và bảo quản trên đá. Một giờ trước khi kết thúc việc ủ đĩa tế bào, 50 µL GST-Raf-RBD được pha loãng trong dung dịch đệm gắn kết/phân giải, và dung dịch đệm được bổ sung vào đĩa thử nghiệm ELISA và nó được ủ trong 1 giờ ở 4 °C trong khi lắc nhẹ. Sau 2 giờ, các tế bào được rửa bằng 100 µL trong PBS đã làm lạnh bằng đá và phân giải bằng 100 µL dung dịch đệm gắn kết/phân giải. Đĩa tế bào này được lắc trong 10 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Tiếp theo, ly tâm đĩa tế bào này ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Trong thời gian này, 1X dung dịch đệm rửa được điều chế ở nhiệt độ môi trường xung quanh và tiếp theo, được dùng để rửa (3 x 100 µL) đĩa thử nghiệm được phủ GST-Raf-RBD. Sau khi rửa, 50 µL dịch phân giải tế bào được bổ sung vào đĩa thử nghiệm được phủ GST-Raf-RBD và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi lắc nhẹ. Trong thời gian ủ, 1X dung dịch đệm gắn kết kháng thể được điều chế và tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Đĩa thử nghiệm được rửa 3 x 100 µL bằng 1X dung dịch đệm rửa và tiếp theo, 50 µL kháng thể sơ cấp (được pha loãng với tỷ lệ 1:500 trong 1x dung dịch đệm gắn kết kháng thể) được bổ sung vào. Đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Đĩa thử nghiệm được rửa 3 x 100 µL bằng 1X dung dịch đệm rửa và tiếp theo, 50 µL kháng thể thứ cấp (được pha loãng với tỷ lệ 1:500 trong 1x dung dịch đệm gắn kết kháng thể) được bổ sung vào và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Đĩa thử nghiệm này được rửa 4 x 100 µL with 1X dung dịch đệm rửa và tiếp theo, 50 µL dung dịch làm việc hóa học phát quang được bổ sung vào ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Tiếp theo, đĩa thử nghiệm được đọc trên đầu đọc đĩa EnVision™ (Perkin Elmer) bằng cách sử dụng chương trình huỳnh quang.

Tín hiệu được chuyển hóa thành phần trăm ức chế bằng cách sử dụng phương trình sau:

Mức ức chế theo % = 100 – [(Tín hiệu Hợp chất thử nghiệm – Tín hiệu Tối thiểu trung bình)/(Tín hiệu Tối đa trung bình – Tín hiệu Tối thiểu trung bình) x 100]. Tín hiệu tối đa là giếng đối chứng không có chất ức chế. Tín hiệu tối thiểu là giếng đối chứng chứa chất ức chế tham khảo đủ để ức chế hoàn toàn hoạt tính. IC_{50} được xác định bằng cách điều chỉnh mức ức chế theo phần trăm ở mỗi nồng độ chất ức chế vào phương trình phương trình logistic phi tuyến bốn tham số sử dụng Genedata Screene®: y = (A+((B-A)/(1 + ((C/x)^D)))) trong đó, y = % ức chế, A = đường tiệm cận tối thiểu, B = đường tiệm cận tối đa, C = IC_{50} tương đối hoặc nồng độ chất ức chế tạo ra sự ức chế 50% trong khoảng hiệu chỉnh của cả hai đường tiệm cận, và D = sườn đồi.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được đánh giá trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Các hợp chất của các Ví dụ thể hiện khả năng ức chế hoạt tính RAS GTPaza cơ định. Hợp chất của Ví dụ 1, ví dụ, thể hiện IC_{50} tương đối là 0,00672 μM, n = 4 trong thử nghiệm này. Dữ liệu này cho thấy rằng các hợp chất của các Ví dụ thể hiện hoạt tính ức chế KRas-GTP trong nuôi cấy tế bào ung thư phổi ở người này.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào 3D H358

Mục đích của thử nghiệm này được để đánh giá sự ức chế của hợp chất thử nghiệm trong thử nghiệm tăng sinh 3D bằng cách sử dụng tế bào ung thư phổi của người, H358, (ATCC CRL-5807). Tín hiệu phản ánh sự tăng sinh tế bào được phát hiện bằng chất phản ứng CellTiterGlo® 3D (Promega G9683). Các tế bào được nuôi trong RPMI 1640 (GIBCO®) được bổ trợ 10 % FBS được làm bất hoạt bằng nhiệt và 0,1 mg/mL penicillin/streptomycin. Các tế bào H358 được nuôi cấy trong pha phát triển và năm ngàn tế bào mỗi giếng được dàn mỏng trong đĩa bề mặt gắn kết siêu thấp 96 giếng đáy tròn trong suốt giếng màu đen (Corning® Cat 4520) với 80 μL môi trường nuôi cấy/giếng. Các tế bào được ủ qua đêm ở 37 °C trong buồng điều ẩm. 20 μL/giếng hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy được bổ sung vào đĩa này mà tiếp theo, nó được ủ trong 96 giờ. Các đĩa được tăng đến nhiệt độ môi trường xung quanh và một thể tích tương ứng của chất phản ứng CellTiterGlo® 3D ở nhiệt độ môi

trường xung quanh được bổ sung vào. Các đĩa được lắc ở vận tốc 750 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh để ổn định tín hiệu, tín hiệu phát quang được đo trên thiết bị đọc đĩa EnVision™. Tín hiệu được chuyển hóa thành phần trăm ức chế bằng cách sử dụng phương trình sau: Mức ức chế theo % = 100 – [(Tín hiệu Hợp chất thử nghiệm – Tín hiệu Tối thiểu trung bình)/(Tín hiệu Tối đa trung bình – Tín hiệu Tối thiểu trung bình) x 100]. Tín hiệu tối đa là giếng đối chứng không có chất ức chế. Tín hiệu tối thiểu là giếng đối chứng chứa chất ức chế tham khảo (trametinib) đủ để ức chế hoàn toàn sự tăng sinh tế bào. IC_{50} được xác định bằng cách điều chỉnh mức ức chế theo phần trăm ở mỗi nồng độ chất ức chế vào phương trình phương trình logistic phi tuyến bốn tham số sử dụng Genedata Screene®: y = (A+((B-A)/(1 + ((C/x)^D)))) trong đó, y = % ức chế, A = đường tiệm cận tối thiểu, B = đường tiệm cận tối đa, C = IC_{50} tương đối hoặc nồng độ chất ức chế tạo ra sự ức chế 50% trong khoảng hiệu chỉnh của cả hai đường tiệm cận, và D = sườn đồi.

Hợp chất trong phạm vi sáng chế được đánh giá trong thử nghiệm này về cơ bản là như được mô tả trên đây. Hợp chất của Ví dụ 1, ví dụ, thể hiện IC_{50} tương đối là 0,0083 µM trong thử nghiệm này. Dữ liệu này cho thấy rằng hợp chất của Ví dụ 1 ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư phổi của người H358.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào CellTiterGlo®

Mục đích của thử nghiệm này được để đánh giá sự phát triển của dòng khối u đột biến KRas G12C sau khi điều trị bằng hợp chất thử nghiệm. Nhóm dòng tế bào khối u mang KRas G12C hoặc các đột biến KRas khác được gom (Bảng 25). Tất cả các dòng tế bào đều được lấy từ ATCC hoặc các nguồn khác đều được chỉ rõ.

Các tế bào điển hình được nuôi cấy trong RPMI1640 hoặc môi trường Eagle cải biến bằng Dulbecco (DMEM, GIBCO) được bổ trợ 10% FBS (GIBCO, Invitrogen). Đối với các tế bào nuôi cấy 2D ($4x10^3$/giếng) được duy trì trong môi trường sinh trưởng được mô tả trên đây, dàn mỏng vào đĩa nuôi cấy mô 96 giếng (Corning® Cat. 3603) một ngày trước khi điều trị. Các tế bào được xử lý bằng hợp chất trong 96 giờ, và tiếp theo, phân tích khả năng sống sót bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống sót tế bào phát quang CellTiterGlo® (CellTiterGlo®

Luminescent Cell Viability Assay® - Promega #G7572 dành cho 2D) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thiết bị đọc đĩa EnVision™. Các đường cong đáp ứng liều xích-ma và hồi quy không tuyến tính được sử dụng để tính toán nồng độ ức chế nửa cực đại (IC_{50}) với phần mềm Graphpad Prism 4®.

Bảng 25: Hoạt tính chống tăng sinh in vitro của các Ví dụ 1, 34-36 trong nhóm dòng tế bào khối u đột biến KRas G12C

Dòng tế bào	Ví dụ 1		Ví dụ 34		Ví dụ 35		Ví dụ 36	
	% ức chế @ 10µM	IC50 (µM)	% ức chế @ 10µM	IC50 (µM)	% ức chế @ 10µM	IC50 (µM)	% ức chế @ 10µM	IC50 (µM)
H358 (phổi)	94,5	0,004	95,6	0,002	96,4	0,002	89,1	0,008
SW1463 (ruột kết)	95,3	0,006	90,1	0,004	94,3	0,005	82,7	0,014
MiaPaca-2 (tụy)	77,2	0,018	82,9	0,01	85,8	0,011	79,6	0,081
H23 (phổi)	98,2	0,045	96,8	0,026	98	0,024	96,7	0,1
LU99 (phổi)	89,9	0,303	91,9	0,201	96,6	0,173	99,1	0,349
SW837 (trực tràng)	60,8	0,25	59,6	0,2	64,2	0,33	58,7	0,57
HCC44 (phổi)	46,4	>10	41	>10	64,3	2,23	80,6	2,839
LXFA-983L (phổi)	78,6	3,609	68,8	>10	83,1	>10	88	>10
H2122 (phổi)	80,4	1,17	78,1	0,66	79,7	0,9	92,8	1,36
SW756 (cổ tử cung)	51,9	1,63	56,9	1,08	56,7	1,55	58,1	2,52
Calu-1	45,4	>10	50,6	1,14	56	0,48	77,4	2,925

(phổi)								
H1792 (phổi)	63,6	3,011	56,7	4,354	81,7	1,41	97,4	2,032
UM-UC-3 (bàng quang)	54,3	0,73	56,1	0,51	80,4	1,09	91,6	1,86
KYSE-410 (thực quản)	64,6	5,84	63,2	>10	68,3	7,974	43,1	>10
H1373 (phổi)	68,8	1,813	67,7	6,739	86,3	3,544	82,6	5,494
SW1573 (phổi)	35	>10	60,8	7,823	44,7	>10	54,3	9,35
H2030 (phổi)	32,9	>10	41,1	>10	40,3	>10	55,8	>10
A549 (phổi)	19,1	>10	18,8	>10	31,6	>10	62,1	9,5

Dữ liệu chỉ ra rằng các hợp chất của các Ví dụ 1, 34-36 ức chế sự phát triển của nhiều dòng tế bào khối u đột biến KRas G12C được nêu trong Bảng 26.

Như đươc tổng kết trong Bảng 25, các hợp chất của Ví dụ 1, 34-36 thể hiện hoạt tính chống tăng sinh trên hầu hết các tế bào khối u mang đột biến KRas G12C trong điều kiện nuôi cấy 2D. Ở tế bào A549 mang đột biến KRas G12S, các hợp chất của các Ví dụ 1, 34-36 thể hiện hoạt tính không đáng kể, đề xuất rằng các Ví dụ 1, 34-36 ức chế một cách chọn lọc các tế bào khối u mang đột biến KRas G12C.

Ức chế chất đánh dấu dược động học (PD) KRas G12C trong mô hình ghép ngoại lai H358 và mô hình ghép ngoại lai MiaPaca-2 ung thư tuyến tụy

Mục đích của các thử nghiệm này được để đánh giá sự ức chế đích *in vivo* của hợp chất thử nghiệm được dùng qua đường miệng. Tế bào ung thư phổi H358, hoặc tế bào ung thư tuyến tụy MiaPaca-2 ở người, được cấy vào mô hình khối u ghép ngoại lai ở chuột trụi lông. Tế bào H358 hoặc MiaPaca-2 (10×10^6 trong hỗn hợp với Matrigel® với tỷ lệ 1:1, 0,2 mL tổng thể tích) được cấy bằng cách tiêm dưới da vào

chân sau của chuột cái trụi lông (Harlan Laboratories). Tổng số từ 3-4 con chuột trong mỗi nhóm được sử dụng để ràng buộc đích và nghiên cứu PD. Việc điều trị được bắt đầu bằng cách dùng qua đường miệng (ống thông) hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (20% Captisol®, 25 mM phosphat, pH 2,0 trong 0,2 mL) khi kích thước khối u đạt khoảng 300 mg.

Đối với việc ức chế đích *in vivo* và phân tích PD, các khối u được nghiền bằng cối và chày trên đá khô và các mảnh khối u được bổ sung vào 800 µL dung dịch đệm phân giải chứa 1% Triton™ X-100, 25 mM Tris pH7,5, 150 mM natri clorua, 1 mM EDTA, và 1 mM EGTA với hỗn hợp chất ức chế proteaza và phosphataza Halt (Thermo Scientific, số catalog 1861281) trong ống D ma trận phân giải (MP Biomedical®, số catalog 6913-500) với một giọt lớn bổ sung (giọt cầu gốm MP Biomedical® 1/4" số catalog 6540-412) vào mỗi ống. Các mảnh khối u được đồng nhất hóa trong thiết bị Thermo Bio101® fast prep (FP120) được đặt ở mức 4 trong 15 phút trong khi làm lạnh tổng số 2 lần. Dịch phân giải được quay với tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C để gạn. Việc ước lượng protein được thực hiện trên chất nổi dịch phân giải bằng cách sử dụng thử nghiệm protein BioRad Dc® và dịch phân giải được pha loãng trong dung dịch đệm gắn kết/phân giải hoàn toàn từ Ras GTPaza Chemi ELISA Kit® (Active Motif, số catalog 52097). KRas ELISA hoạt tính được thực hiện như sau: các giếng ELISA được phủ glutathion được ủ với RAF1-GST đã pha loãng trong dung dịch đệm gắn kết/phân giải hoàn toàn trong 1 giờ ở 4 °C trong khi khuấy nhẹ. Các giếng được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa và 100 µg dịch phân giải được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 giờ trong khi khuấy nhẹ. Các giếng được rửa 3 lần nữa, tiếp theo, kháng thể sơ cấp, được pha loãng trong dung dịch đệm gắn kết kháng thể, bổ sung vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ trong 1 giờ. Các giếng được rửa 3 lần nữa trước khi bổ sung kháng thể thứ cấp đã tiếp hợp HRP, pha loãng trong dung dịch đệm gắn kết kháng thể, vào mỗi giếng. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 giờ. Các giếng ELISA được rửa 4 lần, chất phản ứng quang hóa được bổ sung vào và tiếp theo, đọc kết quả phát quang. Đối với pERK Meso Scale Discovery ELISA, 25 µg protein chứa 0,1% SDS được sử dụng; Kit phân giải toàn bộ tế bào phát hiện quy mô Meso cho pERK được cung cấp bởi Meso Scale Discovery.

Ức chế đích *In Vivo* phụ thuộc liều và tác dụng dược động học trên mô hình ghép ngoại lai H388 ung thư phổi:

Mục đích của thử nghiệm này được để đánh giá việc ức chế đích *in vivo* phụ thuộc liều lượng và tác dụng dược động học trên mô hình ung thư phổi. Hợp chất thử nghiệm được dùng liều trên mô hình ghép ngoại lai chuột H388 ung thư phổi với liều lượng nằm trong khoảng từ 12,5 đến 100 mg/kg. Các mẫu khối u được gom 8 giờ sau khi dùng liều đơn. Dịch phân giải khối u được chuẩn bị và việc ức chế pERK và KRas hoạt động được đo như được mô tả trên đây. Kết quả được cung cấp trong Bảng 26; hợp chất của Ví dụ 34 thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều lượng với pERK và KRas hoạt động sau khi điều trị liều đơn với hàm lượng từ 12,5 đến 100 mg/kg vào 8 giờ. Hợp chất của Ví dụ 35 còn thể hiện sự ức chế mạnh với pERK và KRas hoạt tính sau khi điều trị liều đơn với hàm lượng từ 12,5 đến 100 mg/kg. Quan sát được mức ức chế pERK nằm trong khoảng từ 82,2%-90,6 %, và mức ức chế KRas hoạt tính nằm trong khoảng từ 73,4%-94% ở các lượng liều lượng này.

Bảng 26: Sự ức chế phụ thuộc liều với pERK, pMEK và Kras hoạt tính trên mô hình chuột ghép ngoại lai H358

Hợp chất	**Liều (mg/kg)**	**Thời gian**	**% ức chế RAS hoạt tính**	**% ức chế pERK**
Chất dẫn	0	**8**	0	**0**
Ví dụ 35	12,5	**8**	81	**82,2**
	25	**8**	73,4	**85,3**
	50	**8**	94	**90,6**
	100	**8**	91,9	**88,9**
Ví dụ 34	12,5	**8**	14,2	**26,9**
	25	**8**	35,1	**53,2**
	50	**8**	31,5	**54**
	100	**8**	69,3	**74,8**

Sự ức chế đích *In Vivo* phụ thuộc thời gian và tác dụng dược động học trên mô hình chuột ghép ngoại lai H388 ung thư phổi

Mục đích của thử nghiệm này được để đánh giá sự ức chế đích *in vivo* phụ thuộc thời gian và tác dụng dược động học trên mô hình ung thư phổi. Các hợp chất của các Ví dụ 35 và 36 cũng được dùng liều với hàm lượng 30 mg/kg trong thời gian thử nghiệm. Sau khi dùng liều đơn, các mẫu khối u được lấy vào thời điểm 2, 4, 8, 12 và 24 giờ sau đó. Dịch phân giải khối u được chuẩn bị và việc ức chế pERK và KRas hoạt động được đo như được mô tả trên đây. Các kết quả được đề xuất trong bảng 27. Hợp chất của Ví dụ 35 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian với pERK và KRas hoạt động sau khi điều trị liều đơn với lượng 30 mg/kg. Với liều 30 mg/kg, quan sát được mức ức chế pERK 82,6% vàothời điểm 8 giờ, và mức ức chế pERK giảm xuống 65,2% vào 24 giờ. Với KRas hoạt động, mức ức chế 80,2% đạt được vào 8 giờ, và mức ức chế KRas hoạt tính giảm xuống 54,9% vào 24 giờ. Hợp chất của Ví dụ 36 còn thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian với pERK và KRas hoạt động sau khi điều trị liều đơn với lượng 30 mg/kg. Với liều 30 mg/kg, quan sát được mức ức chế pERK 82,6% vào thời điểm 8 giờ, và mức ức chế pERK giảm xuống 48,8% vào 24 giờ. Với KRas hoạt động, mức ức chế 88,5% đạt được vào 8 giờ, và mức ức chế KRas hoạt tính giảm xuống 43,2% vào 24 giờ.

Bảng 27. Mức ức chế phụ thuộc thời gian với pERK và KRas hoạt động trên mô hình H358

Hợp chất	**Liều (mg/kg)**	**Thời gian (giờ)**	**% sự ức chế Ras hoạt động**	**% ức chế pERK**
Chất dẫn	0	4 hoặc 8	0	**0**
Ví dụ 35	30	2	7,6	67,9
	30	4	65,7	73,2
	30	8	80,2	82,6
	30	12	39,3	71,1
	30	24	54,9	65,2
Ví dụ 36	30	2	72,6	79,7
	30	4	72,4	84,2
	30	8	88,5	86,9
	30	24	43,2	48,8

Mức ức chế đích *In Vivo* và tác dụng dược động học trên mô hình chuột ghép ngoại lai MiaPaca-2 ung thư tuyến tụy

Mục đích của thử nghiệm này được để đánh giá mức ức chế đích *in vivo* phụ thuộc thời gian và tác dụng dược động học trên mô hình ung thư tuyến tụy. Hợp chất của các Ví dụ 35 được dùng liều 5, 10 hoặc 30 mg/kg trong thời gian thử nghiệm. Sau khi dùng liều đơn, các mẫu khối u được lấy vào thời điểm 2, 4, 8, 12 và 24 giờ sau đó. Dịch phân giải khối u được chuẩn bị và việc ức chế pERK và KRas hoạt động được đo như được mô tả trên đây. Các kết quả được đề xuất trong bảng 28. Hợp chất của Ví dụ 35 thể hiện mức ức chế phụ thuộc thời gian và liều lượng với pERK và KRas hoạt động sau khi điều trị liều đơn với lượng 5, 10 hoặc 30 mg/kg. Với liều 5 mg/kg, quan sát được mức ức chế 63,8% Ras hoạt động và mức ức chế 50,9% pERK vào thời điểm 4 giờ. Với liều 10 mg/kg, quan sát được mức ức chế 85,5% ức chế Ras hoạt động và mức ức chế 58,5% pERK quan sát được vào thời điểm 4 giờ. Với liều 30 mg/kg, quan

sát được mức ức chế 90,9% Ras hoạt động và mức ức chế 58,7% pERK vào thời điểm 4 giờ, và mức ức chế 60,7% Ras hoạt động được duy trì vào thời điểm 24 giờ.

Bảng 28. Mức ức chế phụ thuộc thời gian và liều của pERK và KRas hoạt động trên mô hình MiaPaca-2

Liều (mg/kg)	**Thời gian điều trị (giờ)**	**% ức chế RAS hoạt động**	**% ức chế pERK**
	4	0	0
5	2	24,3	51
5	4	63,8	50,9
5	8	57	59
5	12	34,3	47,4
5	24	4,3	-30,2
10	2	67,8	68,5
10	4	85,5	58,5
10	8	78,9	57,6
10	12	44,7	49
10	24	22,8	-14,9
30	2	76	59,5
30	4	90,9	58,7
30	8	89	54,3
30	12	68,9	58,4
30	24	60,7	15,6

Hoạt tính chống khối u phát triển trên mô hình chuột ghép ngoại lai H358 mắc ung thư phổi:

Mục đích của thử nghiệm này được để xác định hoạt tính chống khối u của các hợp chất thử nghiệm (Ví dụ 34, 35, và 36) trên mô hình chuột ghép ngoại lai H358 mắc ung thư phổi. Tế bào khối u phổi H358 (10×10^6) được cấy bằng cách tiêm dưới da vào chân sau của chuột cái trụi lông (Taconic Biosciences). Tổng số 4 con chuột

trong mỗi nhóm được sử dụng cho nghiên cứu hiệu lực. Việc điều trị được bắt đầu bằng cách dùng qua đường miệng (ống thông) hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (20% Captisol®, 25 mM phosphat, pH 2,0 trong thể tích 0,2 mL) một hoặc hai lần mỗi ngày trong 28 ngày khi kích thước khối u đạt khoảng 300 mg. Sự sinh trưởng khối u và thể trọng được giám sát theo thời gian để đánh giá hiệu lực và các dấu hiệu liên quan đến tính độc. Kết quả tổng hợp được nêu trong Bảng 29. Với liều lượng 100 mg/kg trong phác đồ liều một lần mỗi ngày, quan sát được sự hồi quy tăng trưởng khối u từ -6,28 đến -30,96% đối với hợp chất Ví dụ 34. Với liều lượng 30 mg/kg trong phác đồ liều hai lần mỗi ngày, quan sát được sự hồi quy tăng trưởng khối u từ -67,68 đến -72,14% với hợp chất Ví dụ 35. Với liều lượng 30 mg/kg trong phác đồ liều hai lần mỗi ngày, đạt được sự phát triển khối u -68,96% với hợp chất Ví dụ 36. Không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể trong toàn bộ các nghiên cứu với các hợp chất.

Bảng 29: Hoạt tính chống phát triển khối u trên mô hình chuột ghép ngoại lai H358 mắc ung thư phổi

Điều trị	**Liều (mg/kg)**	**Phác đồ liều dùng**	**% hồi quy (Ngày 12)**	**% hồi quy (Ngày 26)**
Ví dụ 35	30	PO, BID	-72,14	-67,68
Ví dụ 36	30	PO, BID	-68,96	Không thực hiện
Ví dụ 34	100	PO, QD	-30,96	-6,28

Hoạt tính chống phát triển khối u trên các mô hình ung thư phổi khác và các mô hình ung thư trực tràng, tuyến tụy, bàng quang và thực quản

Ngoài H358 mô hình ghép ngoại lai, hợp chất của Ví dụ 35 được thử nghiệm trên các mô hình ghép ngoại lai hoặc ghép ngoại lai có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX) khác mắc ung thư phổi, trực tràng, tuyến tụy, bàng quang, và thực quản với liều lượng khác nhau. Đối với mô hình ghép ngoại lai của H1373, HCC44, MiaPaca-2, SW1463, KYSE-410 và UM-UC-3, thông thường 5-10 x 10^6 tế bào trong hỗn hợp matrigel với tỷ lệ 1:1 (tổng thể tích 0,2 ml) được cấy bằng cách tiêm dưới da vào chân sau của chuột

trụi lông. Thông thường, tổng số 4 con chuột mỗi nhóm được sử dụng để nghiên cứu hiệu lực. Việc điều trị được bắt đầu bằng cách dùng qua đường miệng (ống thông) hợp chất thử nghiệm hoặc chất dẫn thuốc (20% Captisol®, 25 mM phosphat, pH 2,0) trong thể tích 0,2 mL khi kích thước khối u đạt khoảng 200-300 mg. Sự sinh trưởng khối u và thể trọng được giám sát theo thời gian để đánh giá hiệu lực và các dấu hiệu liên quan đến tính độc. Với mô hình EL3187 PDX, các ống đông lạnh chứa các mảnh khối u được rã đông ở 37 °C trong bể nước. Các mảnh khối u được chuyển vào ống Falcon 50 ml và môi trường DMEM đã làm lạnh bằng nước đá được bổ sung từ từ vào ống này đến tổng thể tích 35 mL. Tiếp theo, các mảnh khối u được ly tâm với tốc độ 130 x g trong 2 phút ở 4 °C và chất nổi được hút. Bước rửa này được lặp lại hai lần và các mảnh khối u được tái tạo huyền phù trong 10 mL DMEM để cấy vào chuột Foxn1nu trụi lông không có tuyến ức (Envigo RMS, Inc., Mount Comfort, Indiana). Ngay khi thể tích khối u đạt tới 800 đến 1000 mm^3, các con chuột bị giết và các khối u được lấy bằng cách sử dụng kỹ thuật vô trùng. Các khối u tươi được cắt thành các mảnh từ 10 đến 15 mm^3 và đặt vào môi trường ngủ đông Gibco lạnh. Các mảnh khối u được cấy dưới da vào các con chuột bằng kim giùi 10 g. Khi kích thước khối u đạt từ 200 đến 300 mm^3, các con chuột được dùng ngẫu nhiên hợp chất điều trị.

Hoạt tính hồi quy hoặc chống phát triển khối u của hợp chất của Ví dụ 35 được tổng kết trong Bảng 30. Trong số các mô hình được nêu trong Bảng 31, EL3187 là mô hình ghép ngoại lai có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX), và tất cả các mô hình khác là ghép ngoại lai khối u. Như được minh họa trong Bảng 31, hợp chất của Ví dụ 35 chứng tỏ hoạt tính chống khối u phụ thuộc liều lượng ở tất cả các mô hình, đề xuất rằng hợp chất của Ví dụ 35 có hoạt tính chống ung thư với KRasG12C đột biến, bao gồm ung thư phổi, trực tràng, tuyến tụy, bàng quang và thực quản.

Bảng 30: Hoạt tính chống khối u phát triển bằng Hợp chất của Ví dụ 35 trên các mô hình ghép ngoại lai ung thư phổi, trực tràng, tuyến tụy, bàng quang và thực quản hoặc PDX.

Mô hình ghép ngoại lai/ PDX (loại khối u)	Mức ức chế phát triển (%) hoặc hồi quy (-%) khối u của Ví dụ 35									
	1 mg/kg		3 mg/kg		5 mg/kg		10 mg/kg		30 mg/kg	
	QD x28	hai lần một ngày x28	QD x28	hai lần một ngày x28	QD x28	hai lần một ngày x28	QD x28	hai lần một ngày x28	QD x28	hai lần một ngày x28
H1373 (phổi)					97,9	-26,3	-21,3	-49	-49,7	
HCC44 (phổi)					28,3	57,5	32,7	61,8	77	84,1
EL3187 (phổi)	52	89,2	-39,8	-91			-96	-96		
MiaPaca-2 (tuyến tụy)					81,7	-36,1	-27	-45,2	-42	-43,6
SW1463 (CRC)					52,5	48,8	78,3	79,5	89,8	98,8
SW837 (CRC)					18,2	83,6	95,2	62,1	83,5	-23,8
KYSE-410 (thực quản)							25,3	51,5	66,7	61,8
UM-UC-3 (bàng quang)					34,3	45,3	33,6	75	83,1	85

Hiệu quả kết hợp in vitro của Hợp chất của Ví dụ 35 với các phép trị liệu hướng đích khác

Ngoài phép đơn trị liệu, hợp chất của Ví dụ 35 được đánh giá về hiệu quả kết hợp của nó với các phép trị liệu hướng đích khác, ví dụ như chất ức chế CDK4 và CDK6 abemaciclib, chất ức chế phân tử nhỏ EGFR erlotinib hoặc afatinib, kháng thể đơn dòng EGFR cetuximab, và chất ức chế ERK LY3214996. Mười một dòng tế bào

cho nghiên cứu này thu được từ ATCC và phát triển trong điều kiện ATCC đề nghị. Tất cả dòng tế bào đều mang đột biến KRAS G12C, và chúng là sáu dòng tế bào ung thư phổi (H358, H1373, H1792, H2030, H2122, SW1573 và HCC44), hai dòng tế bào ung thư đại trực tràng (SW837 và SW1463), một dòng tế bào ung thư tuyến tụy (MiaPaca-2), và một dòng tế bào ung thư thực quản (KYSE410). Thử nghiệm tăng sinh được tiến hành dưới dạng thử nghiệm phát triển 4 ngày bằng cách sử dụng Cell TiterGlo® làm thiết bị đọc. Tóm tắt, tế bào được dàn mỏng trong các đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng và để cho gắn kết qua đêm ở 37°C. Vào ngày tiếp theo, các tế bào được xử lý bằng các hợp chất, bằng các đơn trị liệu hoặc điều trị kết hợp. Đầu tiên, các hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy trong DMSO, tiếp theo là pha loãng vào môi trường nồng độ 5X với 1% DMSO, và cuối cùng, bổ sung vào các tế bào trong môi trường để pha loãng đến 1X. Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 4 ngày nữa. Vào cuối thời gian ủ, chất phản ứng Cell TiterGlo® được trộn và được bổ sung vào các giếng. Sau 10 phút, độ phát quang được đọc bằng thiết bị Perkin Elmer Envision. Trị số IC_{50} tuyệt đối được tạo ra bởi mô hình thống kê 4 tham số cho các phương pháp điều trị đơn lẻ và kết hợp được tạo ra, sau đó là các chỉ số kết hợp cho mỗi phương pháp điều trị kết hợp và dòng tế bào. Trị số kết hợp IC_{50} được điều chỉnh dựa trên tổng nồng độ của mỗi hợp chất khi được bổ sung cùng với nhau. (Ví dụ: với tỷ lệ nồng độ 1:1 giữa hợp chất 1 và hợp chất 2, IC_{50} kết hợp được gia tăng theo hệ số 2). Chỉ số kết hợp (CI) đo lường mức độ mà hiệu lực của một liệu pháp kết hợp khác với hiệu lực dự kiến-nếu-phụ gia và dựa trên định nghĩa của Loewe về độ nhạy.

$$CI = \frac{C_{A,y}}{IC_{A,y}} + \frac{C_{B,y}}{IC_{B,y}}$$

Trong đó

- $C_{A,y}$ và $C_{B,y}$ là nồng độ của các liệu pháp A và B tạo ra hiệu ứng, y, khi được đưa ra kết hợp
- $IC_{A,y}$ và $IC_{B,y}$ và là nồng độ của A và B tạo ra hiệu ứng, y, khi được đưa ra riêng lẻ,

Trong một số trường hợp, nếu trị số IC_{50} ước tính được sử dụng để tính toán CI, thì CI tính toán được được gọi là Chỉ số tiềm năng. Cách giải thích sinh học của

sự kết hợp hoặc chỉ số tiềm năng như sau: hiệp đồng nếu chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng <0,5, cộng hợp nếu chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng từ 0,5 đến 2 và đối kháng nếu chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng > 2.

Như được trình bày trong Bảng 31, sự kết hợp của hợp chất của Ví dụ 35 và abemaciclib có tác dụng cộng hợp hoặc hiệp đồng trong việc ức chế các tế bào khối u có đột biến KRasG12C. Trong số mười một dòng tế bào được thử nghiệm, các hiệu ứng cộng hợp được quan sát thấy trong năm dòng tế bào, với Chỉ số kết hợp (CI) từ 0,5 đến 1,2 và tác động hiệp đồng được quan sát thấy ở sáu dòng tế bào, với CI <0,5, cho thấy rằng sự kết hợp của hợp chất Ví dụ 35 và abemaciclib có thể mang lại lợi ích cho bệnh nhân ung thư có đột biến KRas G12C.

Bảng 31: Hiệu quả kết hợp in vitro của Hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế CDK4/ CDK6 Abemaciclib

Tên dòng tế bào	**Hợp chất**	**Hợp chất IC50 (μM)**	**Ví dụ 35 IC50 (μM)**	**IC50 kết hợp (μM)**	**Chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng**
SW1463	Abemaciclib	0,16253	0,001089422	0,001861309	0,859990152
SW837	Abemaciclib	3,2175	0,413147553	0,276563347	0,377680849
H358	Abemaciclib	0,47697	0,003199233	0,006847357	1,077334012
HCC44	Abemaciclib	3,64845	1,764025208	2,86634865	1,205263179
NCI-H1373	Abemaciclib	4,27817	0,403993227	0,11698021	0,158451664
NCI-H1792	Abemaciclib	0,40097	0,118134759	0,041106255	0,225239313
NCI-H2030	Abemaciclib	1,81728	0,819557983	0,357361105	0,316343687
NCI-H2122	Abemaciclib	0,32737	0,031200861	0,02784263	0,488708133
SW1573	Abemaciclib	0,35607	10,7632	0,614058717	0,890789114
KYSE-410	Abemaciclib	1,94423	4,89618484	0,773507455	0,277914318
MIAPACA2	Abemaciclib	0,28033	0,00748134	0,01060427	0,727628496

Như được thể hiện trong Bảng 32, sự kết hợp của hợp chất trong Ví dụ 35 và chất ức chế phân tử nhỏ EGFR erlotinib hoặc afatinib có tác dụng cộng hợp hoặc hiệp đồng trong việc ức chế các tế bào khối u mang đột biến KRasG12C. Đối với sự kết hợp erlotinib, trong số mười một dòng tế bào được thử nghiệm, một hiệu ứng cộng hợp được quan sát thấy trong năm dòng tế bào, với Chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng từ 0,5 đến 1,15 và hiệu ứng hiệp đồng được quan sát thấy trong sáu dòng tế bào, với Chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng <0,5. Đối với sự kết hợp afatinib, trong số chín dòng tế bào được thử nghiệm, một hiệu ứng cộng hợp được quan sát thấy trong bốn dòng tế bào, với CI từ 0,5 đến 1,1 và tác động hiệp đồng được quan sát thấy trong năm dòng tế bào, với CI <0,5. Những dữ liệu này cho thấy rằng sự kết hợp của Ví dụ 35 và chất ức chế phân tử nhỏ EGFR có thể mang lại lợi ích cho bệnh nhân ung thư mang đột biến KRas G12C.

Bảng 32: Hiệu quả kết hợp in vitro của Hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế phân tử nhỏ EGFR Erlotinib hoặc Afatinib

Tên dòng tế bào	**Hợp chất**	**Hợp chất IC50 (μM)**	**Ví dụ 35 IC50 (μM)**	**IC50 kết hợp (μM)**	**Chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng**
SW1463	Erlotinib	0,40193	0,001089	0,002231	1,026498376
SW837	Erlotinib	>10	0,413148	0,140876	0,170491111
H358	Erlotinib	2,19247	0,003199	0,007357	1,151488525
HCC44	Erlotinib	>10	1,764025	1,567802	0,444381951
NCI-H1373	Erlotinib	>10	0,403993	0,411429	0,509203323
NCI-H1792	Erlotinib	>10	0,118135	0,090106	0,381370715
NCI-H2030	Erlotinib	>10	0,819558	0,424816	0,259174125
NCI-H2122	Erlotinib	12,1511	0,031201	0,030705	0,493309984
SW1573	Erlotinib	>10	10,7632	11,32891	0,526279729
KYSE-410	Erlotinib	>10	4,896185	1,153993	0,11784619
MIAPACA2	Erlotinib	>10	0,007481	0,015373	1,027399401

SW1463	Afatinib	0,05612	0,003248	0,003838	0,625028705
SW837	Afatinib	1,28333	0,321329	0,06905	0,134347371
H358	Afatinib	0,30551	0,002231	0,004945	1,11655131
NCI-H1373	Afatinib	2,21668	0,255708	0,090101	0,196502052
NCI-H1792	Afatinib	3,39177	0,903764	0,2928	0,205152445
NCI-H2122	Afatinib	1,45096	0,03372	0,019501	0,295874375
SW1573	Afatinib	1,58254	12,736	2,456936	0,872720042
KYSE-410	Afatinib	0,65031	4,058337	0,041564	0,03707842
MIAPACA2	Afatinib	1,94391	0,005951	0,011389	0,959906159

Như được thể hiện trong Bảng 33, sự kết hợp của hợp chất của Ví dụ 35 và kháng thể EGFR cetuximab có hiệu quả cộng hợp hoặc hiệp đồng trong việc ức chế các tế bào khối u có đột biến KRas G12C. Trong số mười một dòng tế bào được thử nghiệm, năm dòng tế bào có tác dụng cộng hợp với Chỉ số tiềm năng (CI) từ 0,5 đến 1,06 và sáu dòng tế bào có tác động cộng hợp với Chỉ số tiềm năng <0,5, cho thấy rằng sự kết hợp của Ví dụ 35 và Cetuximab có thể mang lại lợi ích cho bệnh nhân ung thư mang đột biến KRasG12C.

Bảng 33: Hiệu quả kết hợp in vitro của Ví dụ 35 và kháng thể EGFR Cetuximab

Tên dòng tế bào	**Hợp chất**	**Hợp chất IC50 (µM)**	**Ví dụ 35 IC50 (µM)**	**IC50 kết hợp (µM)**	**Chỉ số tiềm năng**
SW1463	Cetuximab	>20	0,001089422	<0,00152	<0,4663
SW837	Cetuximab	>20	0,413147553	0,059912256	0,048338062
H358	Cetuximab	>20	0,003199233	0,004884468	0,508920734
HCC44	Cetuximab	>20	1,764025208	5,643865533	1,066474845
NCI-H1373	Cetuximab	>20	0,403993227	0,433760358	0,357894084
NCI-H1792	Cetuximab	>20	0,118134759	0,054252171	0,153079899
NCI-H2030	Cetuximab	>20	0,819557983	2,161595154	0,879171131

NCI-H2122	Cetuximab	>20	0,031200861	0,021630045	0,23108385
SW1573	Cetuximab	>20	10,7632	23,86318501	0,739036253
KYSE-410	Cetuximab	>20	4,89618484	1,117690734	0,076092629
MIAPACA2	Cetuximab	>20	0,00748134	0,018187633	0,810355342

Như được thể hiện trong Bảng 34, sự kết hợp của hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế ERK LY3219446 có hiệu quả cộng hợp hoặc hiệp đồng trong việc ức chế các tế bào khối u mang đột biến KRas G12C. Trong số mười dòng tế bào được thử nghiệm, hiệu ứng cộng hợp được quan sát thấy ở 5 dòng tế bào, với CI từ 0,5 đến 1,2 và hiệu ứng cộng hợp được quan sát thấy ở 5 dòng tế bào, với Chỉ số kết hợp hoặc tiềm năng <0,5, cho thấy sự kết hợp đó của Ví dụ 35 và chất ức chế ERK có thể mang lại lợi ích cho bệnh nhân ung thư mang đột biến KRas G12C.

Bảng 34: Hiệu quả kết hợp in vitro của Hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế ERK LY3214996

Tên dòng tế bào	**Hợp chất**	**Hợp chất IC50 (uM)**	**Ví dụ 35 IC50 (uM)**	**IC50 kết hợp (uM)**	**Chỉ số tiềm năng hoặc kết hợp**
SW1463	LY3214996	0,42099	0,001089	0,001225	0,563579
SW837	LY3214996	3,4288	0,413148	0,149674	0,202965
H358	LY3214996	1,67124	0,001854	0,004485	1,210955
HCC44	LY3214996	3,26824	1,764025	1,988401	0,867799
NCI-H1373	LY3214996	9,2603	0,403993	0,304663	0,393514
NCI-H1792	LY3214996	3,51533	0,862901	1,310947	0,946077
NCI-H2122	LY3214996	1,60091	0,108719	0,068988	0,338821
SW1573	LY3214996	>10	10,7632	8,05786	0,374325
KYSE-410	LY3214996	4,59338	4,896185	2,178332	0,459569
MIAPACA 2	LY3214996	0,8405	0,00628	0,014545	1,166658

Hiệu quả kết hợp in vitro của Hợp chất của Ví dụ 35 với hóa trị liệu

Hợp chất của Ví dụ 35 cũng được kết hợp với hóa trị, bao gồm pemetrexed, carboplatin hoặc cisplatin, trong ba dòng tế bào ung thư phổi, H1792, H358 và H2122, in vitro. Như được trình bày trong Bảng 35, đối với sự kết hợp pemetrexed, tác dụng cộng hợp hoặc hiệp đồng quan sát được dựa trên CI. Các tác dụng kết hợp tương tự cũng được quan sát thấy khi kết hợp carboplatin và cisplatin.

Bảng 35: Hiệu quả kết hợp in vitro của Hợp chất của Ví dụ 35 và hóa trị liệu (Chỉ số kết hợp).

Dòng tế bào	**NCI-H1792**	**NCI-H358**	**NCI-H2122**
ABS_IC50_Ví dụ 35 (uM)	0,8399	0,001	0,209
ABS_IC50_pemetrexed (uM)	20	20	0,003739
ABS_IC50_kết hợp (uM)	1,305	0,001	0,000084
Chỉ số kết hợp	0,809	0,5	0,011
ABS_IC50_carboplatin (uM)	20	20	20
ABS_IC50_kết hợp (uM)	2,6	0,001	0,0363
Chỉ số kết hợp	1,616	0,5	0,087
ABS_IC50_cisplatin (uM)	0,312	0,773	1,163
ABS_IC50_kết hợp (uM)	0,134	0,001	0,15
Chỉ số kết hợp	0,296	0,5	0,422

Hiệu quả kết hợp in vivo của Ví dụ 35 với các phép trị liệu hướng đích khác

Hợp chất của Ví dụ 35 được đánh giá khi kết hợp với abemaciclib chất ức chế CDK4/CDK6, chất ức chế phân tử nhỏ EGFR erlotinib hoặc afatinib, kháng thể đơn

dòng kháng EGFR cetuximab hoặc chất ức chế ERK LY3214996, trong mô hình động vật PDX. Tổng cộng có sáu mô hình ghép khác loài hoặc PDX in vivo - bốn mô hình phổi (H358, H1373, LU99 và EL3187 PDX), một mô hình đại trực tràng (SW1463) và một mô hình tuyến tụy (MiaPaca-2) - được sử dụng. Bảng 36 tóm tắt tất cả các kết quả nghiên cứu kết hợp in vivo này.

Sự kết hợp giữa hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế CDK4/6 abemaciclib được nghiên cứu trong cả sáu mô hình. Trong tất cả sáu mô hình, sự kết hợp tốt hơn so với hợp chất của Ví dụ 35 hoặc abemaciclib riêng rẽ. Trong bốn mô hình ung thư phổi và trong một mô hình ung thư tuyến tụy, quan sát thấy sự hiệp đồng và sự hồi quy tăng trưởng khối u đáng kể đối với sự kết hợp. Trong mô hình SW1463 của đại trực tràng, tác dụng chống khối u tốt hơn được quan sát thấy so với hợp chất của Ví dụ 35 hoặc abemaciclib riêng rẽ.

Sự kết hợp giữa hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế phân tử nhỏ EGFR erlotinib được thực hiện trong tất cả sáu mô hình. Trong tất cả sáu mô hình, sự kết hợp tốt hơn so với hợp chất của Ví dụ 35 hoặc erlotinib riêng rẽ. Trong ba mô hình ung thư phổi và một mô hình ung thư tuyến tụy, sự hiệp đồng và sự hồi quy tăng trưởng khối u đáng kể được quan sát thấy. Trong mô hình ung thư đại trực tràng SW1463 và mô hình ung thư phổi LU99, sự kết hợp tốt hơn so với hợp chất của Ví dụ 35 hoặc erlotinib riêng rẽ. Trong mô hình ung thư phổi H358 ghép khác loài, tác dụng cộng hợp và tác dụng chống khối u tốt hơn được quan sát thấy khi kết hợp hợp chất của Ví dụ 3 và chất ức chế phân tử nhỏ EGFR afatinib, cho dù so với hợp chất riêng rẽ.

Các nghiên cứu kết hợp in vivo của Ví dụ 35 và cetuximab kháng thể EGFR được thực hiện trong mô hình ghép khác loài ung thư phổi H358 và mô hình ghép khác loài ung thư đại trực tràng SW1463. Trong cả hai mô hình, sự hồi quy tăng trưởng của khối u và hiệu quả kết hợp tốt hơn được quan sát thấy với sự kết hợp. Sự kết hợp này tốt hơn so với hợp chất Ví dụ 35 hoặc cetuximab riêng rẽ.

Sự kết hợp giữa hợp chất của Ví dụ 35 và chất ức chế ERK (ERKi) LY3214996 được nghiên cứu trong tất cả sáu mô hình. Trong tất cả sáu mô hình, tác dụng cộng hợp hoặc hiệp đồng được quan sát thấy cho sự kết hợp và sự kết hợp này tốt hơn so với hợp chất của Ví dụ 35 hoặc chất ức chế ERK riêng rẽ. Trong ba mô hình ung thư

phổi (H358, H1373 và EL3187), một mô hình ung thư tuyến tụy và một mô hình đại trực tràng, quan sát thấy sự hồi quy tăng trưởng khối u đáng kể.

Bảng 36. Tác dụng chống khối u in vivo của Hợp chất của Ví dụ 35 kết hợp với với các phép trị liệu hướng đích khác trên mô hình khối u ghép khác loài hoặc PDX

Điều trị	**Liều dùng (mg/ kg)**	**Liều dùng**	**Mức ức chế sự phát triển khối u (%) và hồi quy (-%) trên mô hình khối u ghép khác loài hoặc PDX**							
			H358 (phổi)		**H1373 (phổi)**	**EL3187 (phổi PDX)**	**Mia Paca-2 (Pancr)**	**SW1463 (CRC)**		**LU99 (phổi)**
Ví dụ 35	3	QDx28	-	-	-	85,2	-	-	-	-
	10	QDx28	74,9	46,6	98,5		-27	44	68,7	
	30	QDx28	-	-	-	-	-	-	-	76,2
ERKi	100	QDx28	71,1	-	85,2	85,4	46,5	-	92,7	28,6
abemaciclib	50	QDx28	77	-	77,6	41,3	45,1	53	-	(-21,5)*
erlotinib	25	QDx28	76,9	-	50,6	29,5	(-77,7)*	40,9		(-23,1)*
cetuximab	20	QDx28	-	87	-	-	-	97,9	94,7	-
afatinib	25	QDx28	-	77,4	-	-	-	-	-	-
Ví dụ 35 + ERKi	10+100	-	-22,1	-	-70,2	-83,3	-65,4		-24,8	-3,7
Ví dụ 35 + abemaciclib	10+50	-	-61,8	-	-54,4	-96	-59,8	81	-	-37,4
Ví dụ 35 + erlotinib	10+25	-	-64	-	-48,9	-89,9	-62,2	88	-	98,9
Ví dụ 35 + cetuximab	30+20	-		-34,6	-	-	-	-20,2	-42,8	-
Ví dụ 35 + afatinib	10+25	-		91,3	-	-	-	-	-	-

* cho thấy thể tích khối u trung bình lớn hơn nhóm đối chứng chất dẫn thuốc

Hiệu quả kết hợp với phép trị liệu miễn dịch, kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1

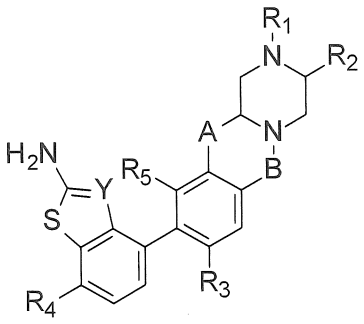
Mô hình hiệp đồng trên chuột được sử dụng để đánh giá tác động của sự ức chế KRas G12C và sự kết hợp liệu pháp miễn dịch. Trong mô hình này, đột biến KRas G12D được chuyển thành đột biến KRas G12C bằng cách kích hoạt CRISPR trong dòng tế bào CT-26, một dòng tế bào khối u đại trực tràng của chuột. Kích thước KRas G12C được xác nhận bằng đặc điểm di truyền và chức năng. Dòng tế bào được thiết kế có tên là CT-26-H4/KRas G12C. Những tế bào này được cấy vào chuột Balb/c và quá trình điều trị bằng hợp chất được bắt đầu sau 6 ngày kể từ khi cấy tế bào khối u. Trong nghiên cứu này, hợp chất của Ví dụ 35 được kết hợp với kháng thể kháng PD-L1 (RMP1 (BioXcell Cat. No. BE0146)) hoặc kháng thể kháng PD-1 (Holmgaard RB, *et al.*, *J. Immunotherapy Cancer 2018*; 6(47): 1-15), với phác đồ liều được liệt kê trong Bảng 37. Như được thể hiện trong Bảng 37, hợp chất của Ví dụ 35 thể hiện hoạt tính đơn tác nhân đáng kể, với mức ức chế trung bình 89,4% sự phát triển của khối u và không có đáp ứng hoàn toàn ở mức 30 mg/kg vào cuối liều 3 tuần. Kháng thể PD-L1 kháng chuột 178G7 cho thấy mức ức chế 36,1% sự phát triển khối u, không có đáp ứng hoàn toàn và kháng thể kháng PD-1 RMP1 cho thấy mức ức chế 70,7% sự phát triển khối u và 10% (1 trong số 10) đáp ứng hoàn toàn ở cuối liều (ngày 21) hoặc ngày 59. Tuy nhiên, sự kết hợp của hợp chất của Ví dụ 35 với kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng PD-1 đạt được hoạt tính chống khối u tốt hơn đáng kể. Vào cuối liều 3 tuần, sự kết hợp của hợp chất của Ví dụ 35 với kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng PD-1 cho thấy sự thoái triển -33,9% và -19,4% của khối u, và lần lượt đáp ứng hoàn toàn 30% và 40%. Sau 3 tuần, việc điều trị kết hợp được dừng lại và tất cả các khối u trong nhóm đơn trị liệu, ngoại trừ 1 con chuột trong nhóm kháng PD-1, bắt đầu phát triển lại. Tuy nhiên, nhiều khối u ở hai nhóm kết hợp không có dấu hiệu phát triển lại. 38 ngày sau liều cuối cùng (ngày 59), các nhóm kết hợp có đáp ứng hoàn toàn 40% và 60%, cho thấy rằng nhiều khối u trong các nhóm kết hợp đã được loại bỏ. Những kết quả này cho thấy việc điều trị bằng hợp chất của Ví dụ 35, kết hợp với kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng PD-1, có thể có lợi cho bệnh nhân ung thư mang đột biến KRas G12C.

Bảng 37: Hoạt tính chống khối u in vivo của Hợp chất của Ví dụ 35 kết hợp với liệu pháp miễn dịch (kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1) trên mô hình hiệp đồng CT-26-H4/KRasG12C

Điều trị	**Liều dùng**	**Tần số liều dùng**	**TGI (T/C) (%)**	**% hồi quy**	**Hồi quy hoàn toàn (ngày 21)**	**Hồi quy hoàn toàn (ngày 59)**
Chất dẫn		PO, QDx21	-	-	0/10	0/10
Ví dụ 35	30 mg/kg	PO, QDx21	89,4 (11,6)	-	0/10	0/10
PD-L1 kháng thể (178G7)	500 µg/con chuột	IP, Q7Dx3	36,1 (63,9)	-	0/10	0/10
Kháng thể PD-1 (RMP1-14)	250 µg/con chuột	IP, BIWx3	-70,7 (29,3)	-	1/10	1/10
Ví dụ 35 + kháng thể PD-L1 (178G7)	30 mg/kg	PO, QDx21	-	-33,9	3/10	4/10
	500 µg/con chuột	IP, Q7Dx3				
Ví dụ 35 + kháng thể PD-1 (RMP1-14)	30 mg/kg	PO, QDx21	-	-19,4	4/10	6/10
	250 µg/con chuột	IP, BIWx3				

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



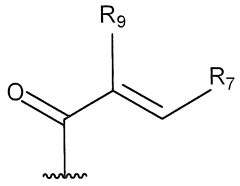
trong đó:

A là $-OCH_2-$, $-N(R_6)CH_2-$, $-OCH_2CH_2-$, $-N(R_6)CH_2CH_2-$, $-CH_2OCH_2-$, hoặc $-CH_2N(R_6)CH_2-$;

B là $-CH_2-$ hoặc -C(O)-;

Y là -C(CN)- hoặc -N-;

R_1 là -CN, $-C(O)C\equiv CR_8$, hoặc nhóm có công thức



;

R_2 là H, metyl, hoặc $-CH_2CN$;

mỗi gốc R_3 và R_5 độc lập là H, halogen, $-C_{0-3}$ alkyl-xyclopropyl, $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10}, hoặc $-O-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_4 là H, halogen, hoặc $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_6 là H hoặc $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_7 là H, halogen, $-NR_{11}R_{12}$, $-CH_2NR_{11}R_{12}$, $-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10} hoặc R_{13}, $-C_{0-3}$ alkyl xyclopropyl, hoặc $-O-C_{1-6}$ alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10} hoặc R_{13};

R_8 là H, -C_{1-4} alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10}, hoặc -C_{3-6} xycloalkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_9 là H, halogen, -CN, -C_{0-3} alkyl-C_{3-6} xycloalkyl, hoặc -C_{1-6} alkyl tùy ý được thế 1-3 lần bằng R_{10};

R_{10} tại mỗi lần xuất hiện độc lập là halogen, oxygen, hydroxy, -C_{1-4} alkyl, hoặc -O-C_{1-4} alkyl;

mỗi gốc R_{11} và R_{12} độc lập là H, -C_{1-4} alkyl, hoặc -C_{1-4} heteroalkyl, trong đó R_{11} và R_{12} có thể kết hợp để tạo thành xycloheteroalkyl; và

R_{13} tại mỗi lần xuất hiện độc lập là -N-C_{1-4} alkyl,

hoặc muối dược dụng của nó.

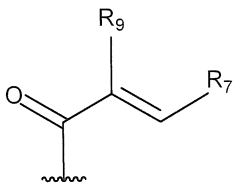
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó A là -OCH_2CH_2-, hoặc muối dược dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó B là -C(O)-, hoặc muối dược dụng của nó.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó Y là -C(CN)-, hoặc muối dược dụng của nó.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó Y là -N-, hoặc muối dược dụng của nó.

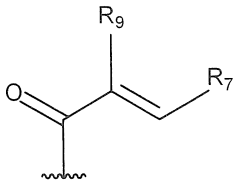
6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó R_1 là nhóm có công thức:



,

và trong đó R_7 là H, F, Cl, metyl, etoxy, etyl, isopropyl, hoặc xyclopropyl, hoặc muối dược dụng của nó.

7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó R_1 là nhóm có công thức:



,

và trong đó R_9 là H, F, Cl, -CHF_2, -CF_3, hoặc -CH_2OH, hoặc muối dược dụng của nó.

8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó R_1 là -CN, -C(O)C≡CR_8, hoặc muối dược dụng của nó.

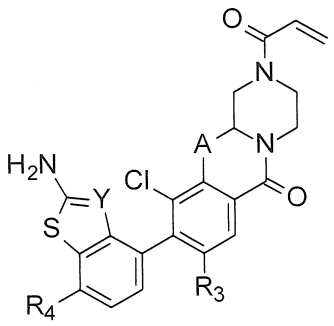
9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó R_2 là H hoặc metyl, hoặc muối dược dụng của nó.

10. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó R_3 là H, F, Cl, metyl, metoxy, etyl, isopropyl, hoặc xyclopropyl hoặc muối dược dụng của nó.

11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó R_4 là H, F, hoặc Cl, hoặc muối dược dụng của nó.

12. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó R_5 là H, -CHF_2, -CH_2F, -CH_2OH, hoặc -CH_2OCH_3, hoặc muối dược dụng của nó.

13. Hợp chất theo điểm 1, có công thức:



trong đó:

A là -OCH_2- hoặc -OCH_2CH_2-;

Y là C(CN) hoặc N;

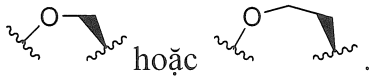
R_3 là Cl hoặc F;

R_4 là H hoặc F khi Y là C(CN); và

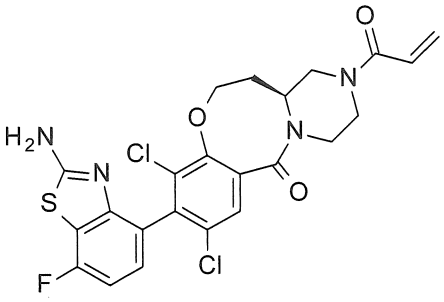
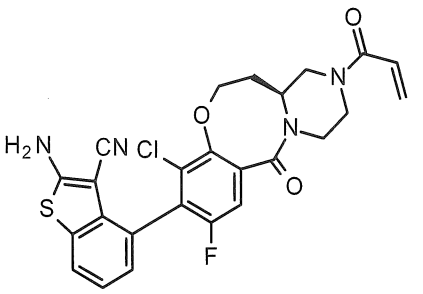
R_4 là F khi Y là N,

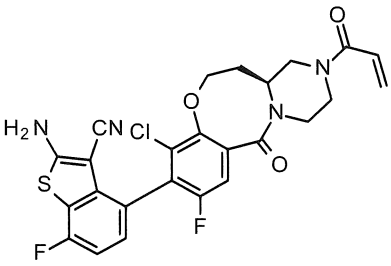
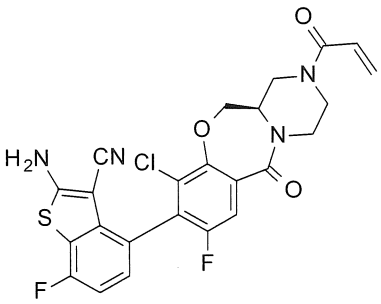
hoặc muối dược dụng của nó.

14. Hợp chất theo điểm 13, trong đó A là:

 hoặc .

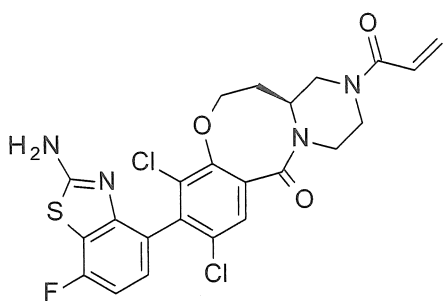
15. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:

 ,  ,

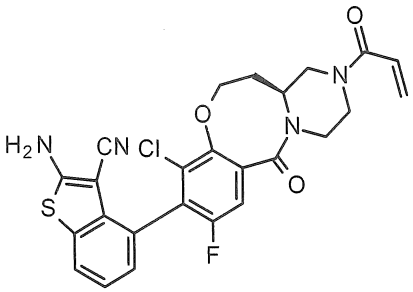
 , hoặc  ,

hoặc muối dược dụng của nó.

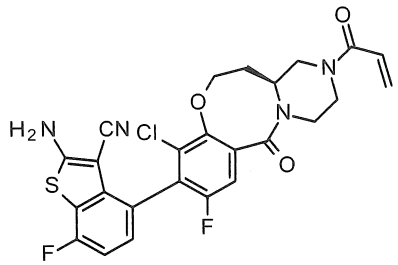
16. Hợp chất theo điểm 15, trong đó hợp chất này là:

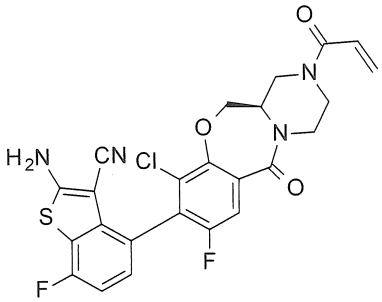


,



,





, hoặc .

17. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, hoặc muối dược dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.