



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0051357

(51)⁷ A61P 31/04; C07H 19/213; C07F
9/6527; C07F 9/6574; A61K 31/7084;
A61P 37/04

(13) B

(21) 1-2019-04886

(22) 17/02/2018

(86) PCT/US2018/018556 17/02/2018

(87) WO 2018/152450 23/08/2018

(30) 62/460,562 17/02/2017 US; 62/479,169 30/03/2017 US; 62/551,647 29/08/2017 US;
62/551,668 29/08/2017 US; 62/551,645 29/08/2017 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/02/2020 383A

(73) Eisai R&D Management CO., LTD. (JP)

6-10, Koishikawa 4-Chome Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8088, Japan

(72) KIM, Dae-Shik (KR); FANG, Frank (US); ENDO, Atsushi (JP); CHOI, Hyeong-
Wook (KR); HAO, Ming-Hong (US); BAO, Xingfeng (CN); HUANG, Kuan-Chun
(US).

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

(54) HỢP CHẤT DI-NUCLEOTIT DẠNG VÒNG VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP
CHẤT NÀY

(21) 1-2019-04886

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất hữu dụng để điều trị bệnh ung thư và được
phẩm chứa các hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất di-nucleotit dạng vòng và được phẩm chứa hợp chất này

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

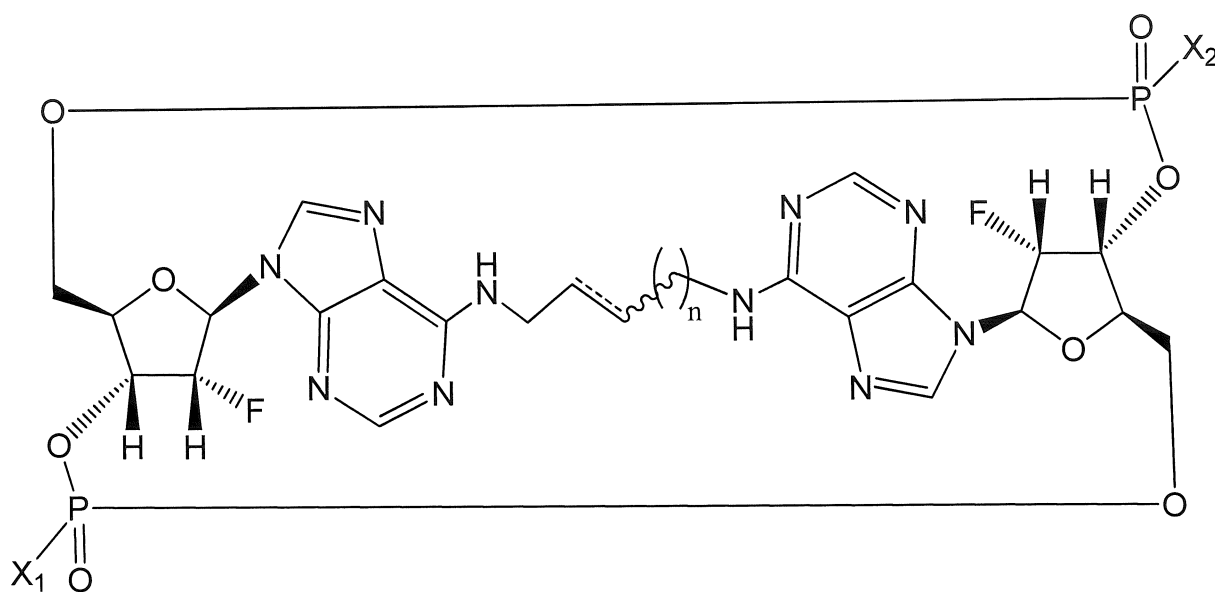
STING (yếu tố ức chế của các gen interferon) là phân tử truyền tín hiệu trong các đáp ứng bẩm sinh với dsADN trong dung dịch bào tương. Sự khuyết STING đã được báo cáo trong nhiều bệnh ung thư ở người. Ngoài ra, sự khử điều hòa của quá trình truyền tín hiệu STING ở các bệnh ung thư trên người cũng đã được báo cáo ở u hắc tố (Xia T, *et al.*, "Recurrent Loss of STING Signaling in Melanoma Correlates with Susceptibility to Viral Oncolysis" *Cancer Res.* 2016) và bệnh ung thư ruột kết. (Xia T, *et al.*, "Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis" *Cell Rep.* 2016;14:282-97). Thú vị là, trong các nghiên cứu này, các kết quả phân tích bộ gen đã chỉ ra sự mất biểu hiện của STING không phải do sự khuyết gen hay đột biến, mà qua các thay đổi biểu sinh. (Xia, *Cancer Res.* 2016; Xia, *Cell Rep.* 2016). Hoạt tính bảo vệ bệnh ung thư của STING cũng được củng cố bởi bằng chứng thu được từ các nghiên cứu trên mô hình chuột nhắt. Chuột bị bất hoạt STING đã cho thấy thiếu hụt trong khả năng kiểm soát khối u. (Woo SR, *et al.* "STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors" *Immunity* 2014;41:830-42).

Ngoài ra, vai trò của STING trong việc bảo vệ sự phát triển của cá thể đã được chứng minh trong một số mô hình nguyên phát của chuột nhắt, bao gồm u thần kinh đệm (Ohkuri T, *et al.*, "Protective role of STING against gliomagenesis: Rational use of STING agonist in anti-glioma immunotherapy" *Oncoimmunology.* 2015;4:e999523), và bệnh ung thư ruột kết (Zhu Q, *et al.*, "Cutting edge: STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation" *J. Immunol.* 2014;193:4779-82). Hiệu quả kháng khối u này có thể là do khả năng chống lại sự hoạt hóa quá mức NF- κ B và STAT3 của nó. (Okihuri 2015). Sự hoạt hóa con đường STING cũng thể hiện hoạt tính tiềm năng ở các mô hình khối u chuột nhắt tiền lâm sàng. (Woo 2014; Chandra D, *et al.* "STING ligand c-di-GMP improves cancer

vaccination against metastatic breast cancer" *Cancer Immunol Res.* 2014;2:901-10; Corrales L, *et al.*, "Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity" *Cell Rep.* 2015;11:1018-30; Curran E, *et al.* "STING Pathway Activation Stimulates Potent Immunity against Acute Myeloid Leukemia" *Cell Rep.* 2016;15:2357-66; Tang CH, *et al.* "Agonist-Mediated Activation of STING Induces Apoptosis in Malignant B Cells" *Cancer Res.* 2016;76:2137-52). Hoạt tính kháng khối u này có khả năng là do sự phá hủy hệ mạch của khối u và sau đó cảm ứng các đáp ứng miễn dịch thích ứng. (Corrales L, *et al.*, "The host STING pathway at the interface of cancer and immunity" *J. Clin. Invest.* 2016;126:2404-11). Do đó, sự kích thích trực tiếp của STING trong môi trường vi mô khối u bởi chất chủ vận có thể là phương pháp mới để điều trị nhiều loại bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo các phương án, sáng chế đề xuất Hợp chất có công thức (I):



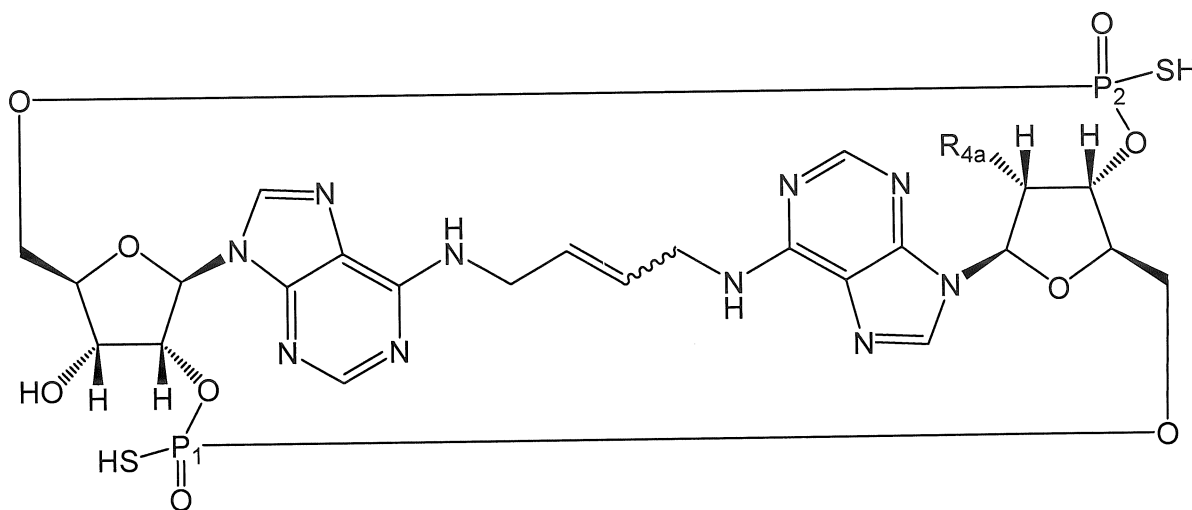
(I)

(trong đó P₁ là phospho thấp hơn bên trái và P₂ là phospho cao hơn bên phải như được mô tả ở trên) có các nhóm thế và hóa học lập thể như được đề cập trong Bảng 1, dưới đây, hoặc muối được dung của chúng. Ký hiệu ----- này chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi. Trong đó nguyên tử phospho có bốn nhóm thế khác nhau, nguyên tử phospho đó sẽ là trung tâm lập thể. SpSp/RpRp/SpRp/RpSp để chỉ hóa học lập thể phospho như được chỉ ra.

Bảng 1.

Hợp chất số	n	Hình học (Trans, Cis, hoặc no)	X ₁	X ₂	Cấu hình hóa học lập thể (P ₁)	Cấu hình hóa học lập thể (P ₂)
1	1	Trans	SH	SH	S	R
2	1	Trans	SH	SH	R	R
3	1	Trans	SH	SH	S	S
4	1	Cis	SH	SH	R	R
5	1	Cis	SH	SH	S	R
6	1	No	SH	SH	S	R
8	2	Trans	SH	SH	Chưa xác định	Chưa xác định
9	1	Trans	OH	OH	Không có sẵn	Không có sẵn
11	2	Trans	SH	SH	Chưa xác định	Chưa xác định
12	2	Trans	SH	SH	Chưa xác định	Chưa xác định

Theo các phương án, sáng chế còn đề xuất Hợp chất có Công thức (II):



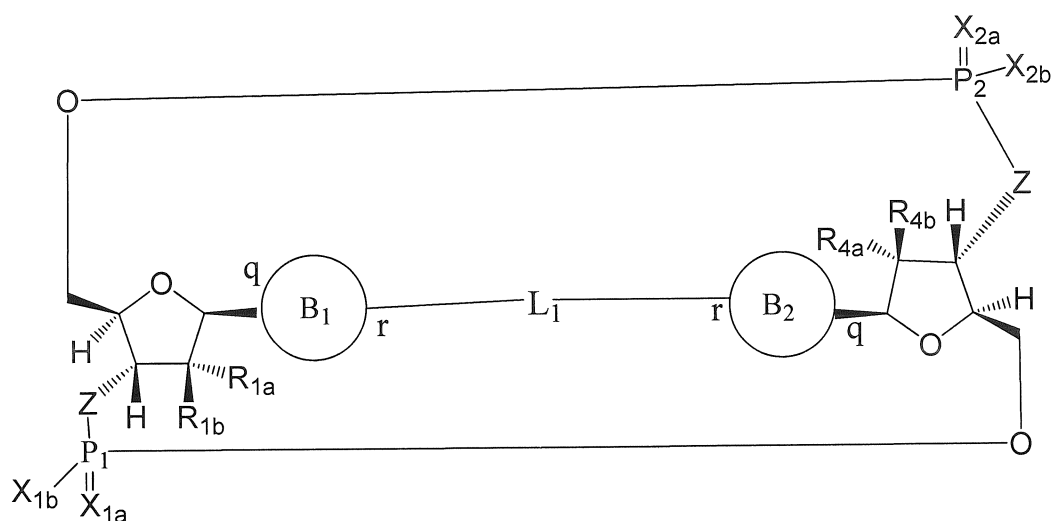
(II)

có các nhóm thế và hóa học lập thể như được đề cập trong Bảng 2, dưới đây, hoặc muối được dung của chúng. Trong đó nguyên tử phospho có bốn nhóm thế khác nhau, nguyên tử phospho đó sẽ là trung tâm lập thể.

Bảng 2.

Hợp chất số	R _{4a}	Cấu hình hình học	Cấu hình hóa học lập thể (P ₁ , P ₂)
13	-OH	Trans	S,R
14	-OH	Trans	R,R
15	-F	Trans	S,R
16	-F	Trans	R,R

Theo các phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức (III):



(III)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{1a} và R_{1b} là $-H$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{4a} và R_{4b} là $-H$;

mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

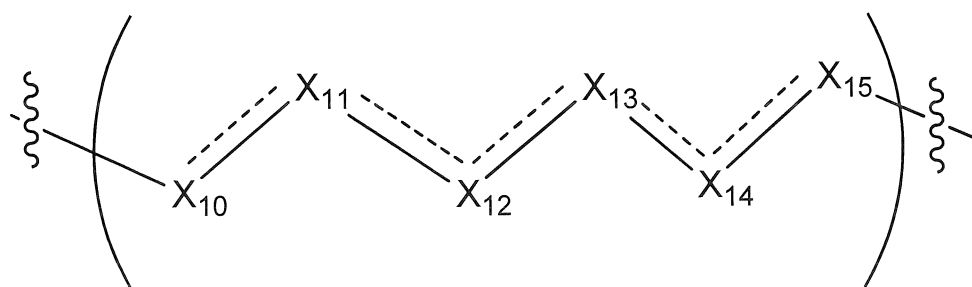
Z là $-O-$ hoặc $-NH-$;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, và $-CH_2OC(O)OC_{1-6}alkyl$;

L_1 trong công thức (III) có chiều dài bốn, năm, hoặc sáu cacbon, và là

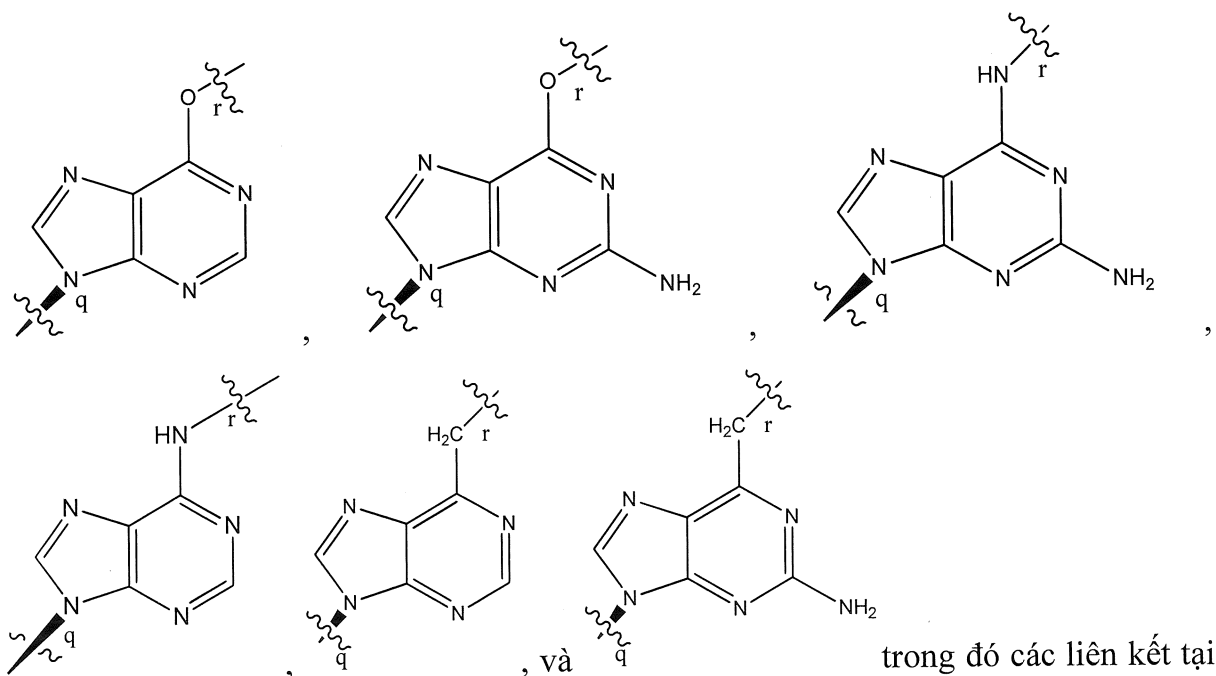


trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba và trong đó (i) 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba; hoặc (ii) 0, 1, hoặc 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về từng liên kết đôi là cis hoặc trans; và (iii) trong đó khi 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba, 0 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi; và (iv) trong đó, khi 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, các liên kết đôi này là các liên kết liên kề hoặc các liên kết xen kẽ;

trong đó X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} độc lập được chọn từ liên kết, $-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{CH}-$, trong đó $-\text{CH}_2-$ hoặc $-\text{CH}-$ không được thế hoặc được thế bởi (i) $-\text{OH}$, (ii) $-\text{F}$, (iii) $-\text{Cl}$, (iv) $-\text{NH}_2$, hoặc (v) $-\text{D}$, và khi X_{10} hoặc X_{15} là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi hoặc liên kết ba;

và trong đó hai thành viên liên kề bất kỳ của nhóm bao gồm X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} có thể tùy ý tạo thành, với các nguyên tử bổ sung, C_3 xycloalkyl hoặc C_3 heteroxycloalkyl, C_3 heteroxycloalkyl này bao gồm nguyên tử N hoặc O;

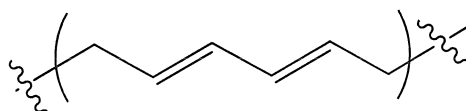
trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:



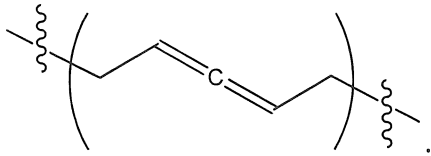
trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B_1 và B_2 được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (III).

Theo một số phương án trong đó L_1 bao gồm liên kết ba hoặc nhiều hơn một liên

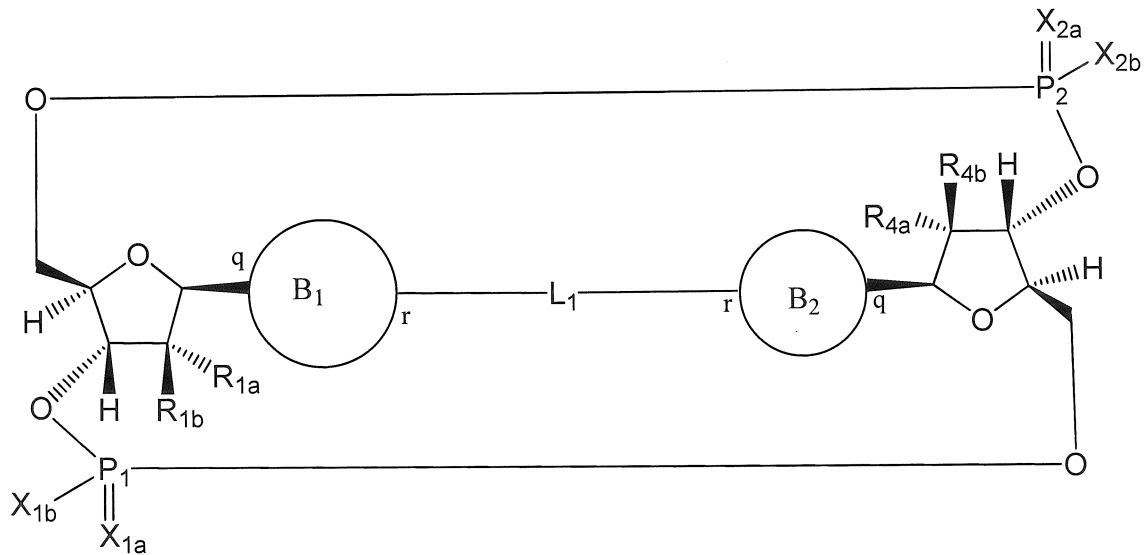
kết đôi, L_1 có thể là, ví dụ,



hoặc



Theo các phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có Công thức (III):



(III)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$, trong đó cả R_{1a} và R_{1b} có thể đều không phải là $-F$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$, trong đó cả R_{4a} và R_{4b} có thể đều không phải là $-F$;

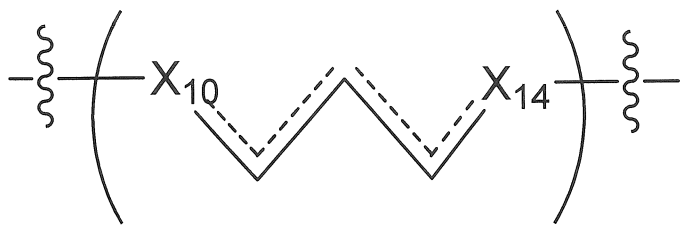
mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R ;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, và $-C(O)C_{1-6}alkyl$;

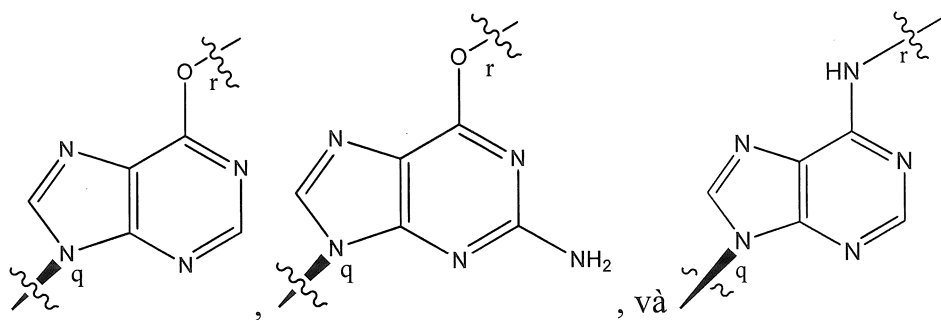
L_1 trong công thức (III) có chiều dài bốn hoặc năm cacbon, và là



trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi, và trong đó 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là cis hoặc trans;

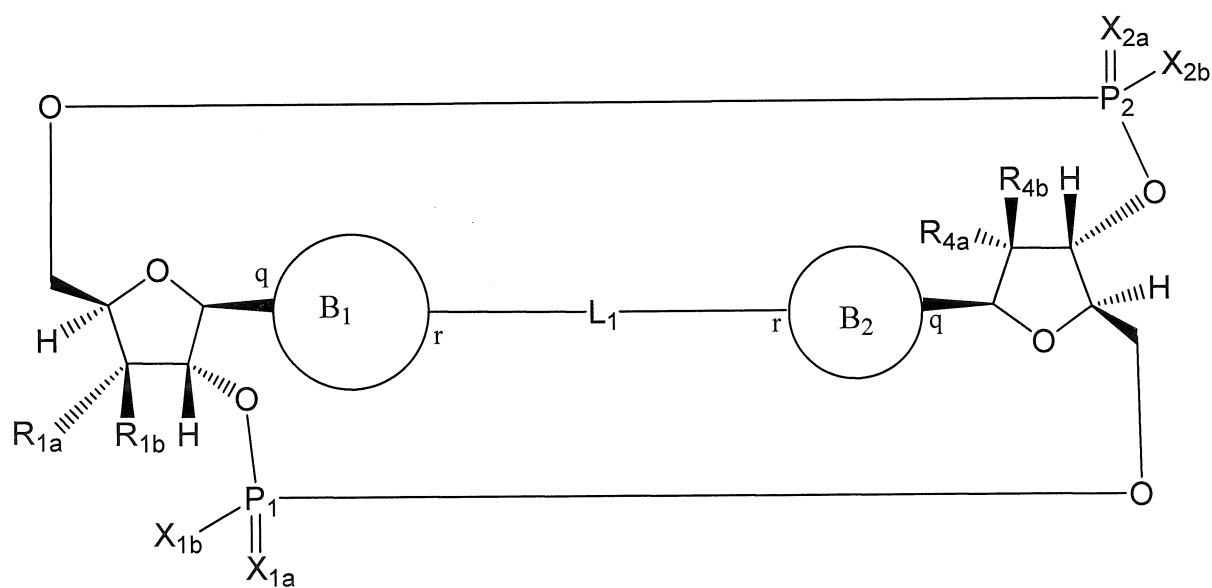
trong đó X_{10} và X_{14} độc lập được chọn từ liên kết, $-\text{CH}-$, hoặc $-\text{CH}_2-$, và trong đó, khi X_{10} hoặc X_{14} là liên kết, liên kết đó không phải là liên kết đôi;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:



, và , trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B_1 và B_2 được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (III).

Theo các phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức (IV):



(IV)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{1a} và R_{1b} là $-H$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{4a} và R_{4b} là $-H$;

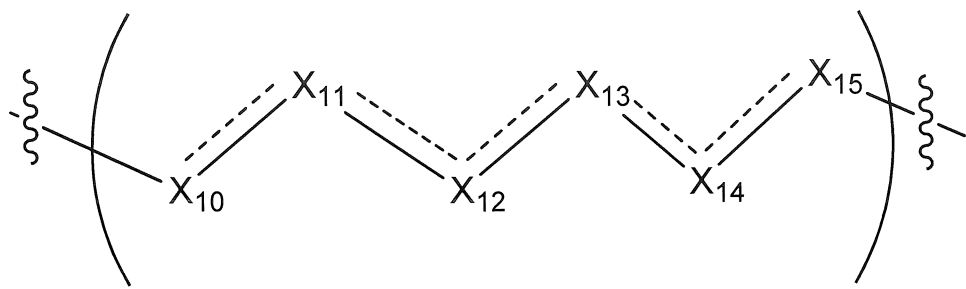
mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, và $-CH_2OC(O)OC_{1-6}alkyl$;

L_1 trong công thức (IV) có chiều dài bốn, năm, hoặc sáu cacbon, và là



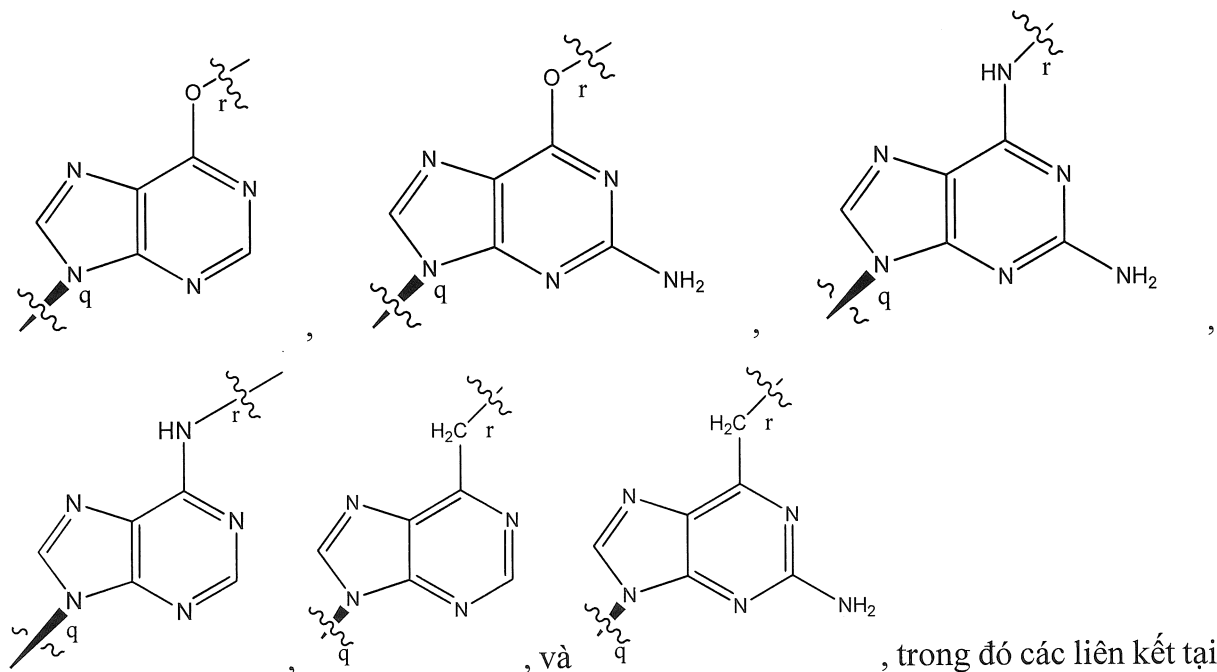
trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba và trong đó (i) 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba; hoặc (ii) 0, 1, hoặc 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về từng liên kết đôi là cis hoặc trans; và (iii) trong đó khi 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba, 0 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi; và (iv) trong đó, khi 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, các liên kết đôi này là các liên kết liên kề hoặc các liên kết xen kẽ;

trong đó X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} độc lập được chọn từ liên kết, $-CH_2-$, hoặc $-CH-$, trong đó $-CH_2-$ hoặc $-CH-$ không được thế hoặc được thế bởi (i) $-OH$, (ii) $-F$, (iii) $-Cl$, (iv) $-NH_2$, hoặc (v) $-D$, và khi X_{10} hoặc X_{15} là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi hoặc liên kết ba;

và trong đó hai thành viên liên kề bất kỳ của nhóm bao gồm X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và

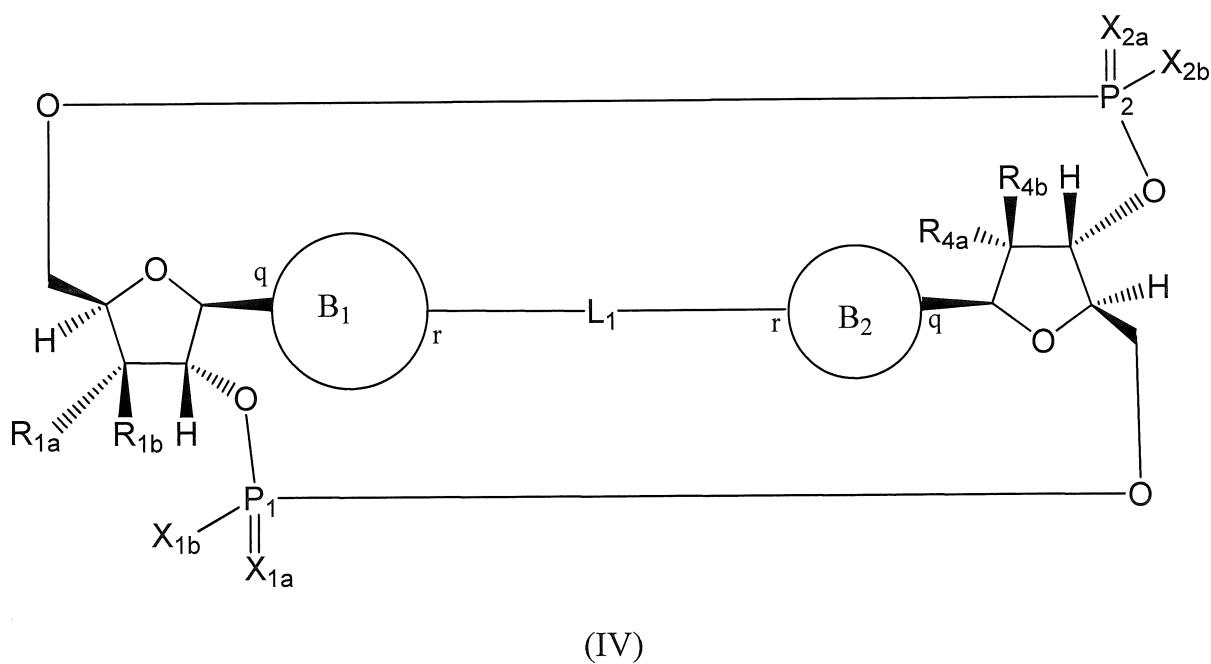
X_{15} có thể tùy ý tạo thành, với các nguyên tử bổ sung, C_3 xycloalkyl hoặc C_3 heteroxycloalkyl, C_3 heteroxycloalkyl này bao gồm nguyên tử N hoặc O;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:



các điểm q và r trên B_1 và B_2 được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (IV).

Theo các phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có Công thức (IV):



hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$, trong đó cả R_{1a} và R_{1b} có thể đều không phải là $-F$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$, trong đó cả R_{4a} và R_{4b} có thể đều không phải là $-F$;

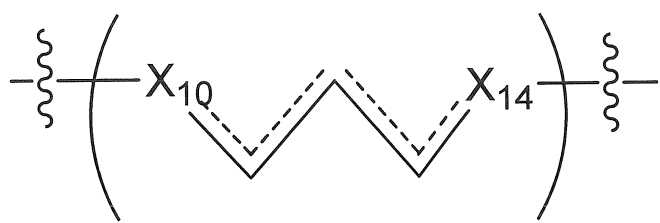
mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R ;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, và $-C(O)C_{1-6}alkyl$;

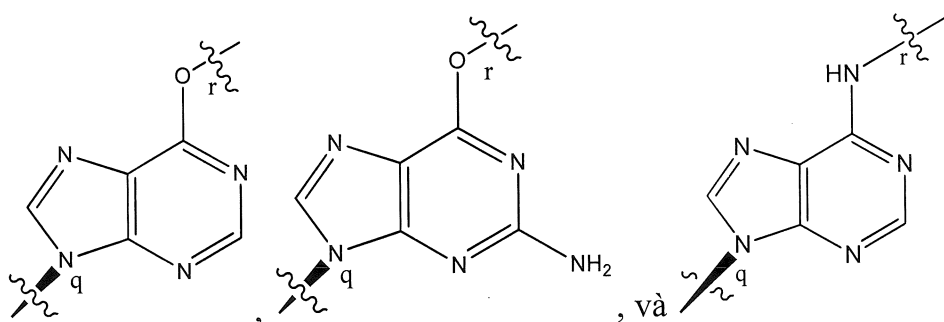
L_1 trong công thức (IV) có chiều dài bốn hoặc năm cacbon, và là



trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi, và trong đó 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là *cis* hoặc *trans*;

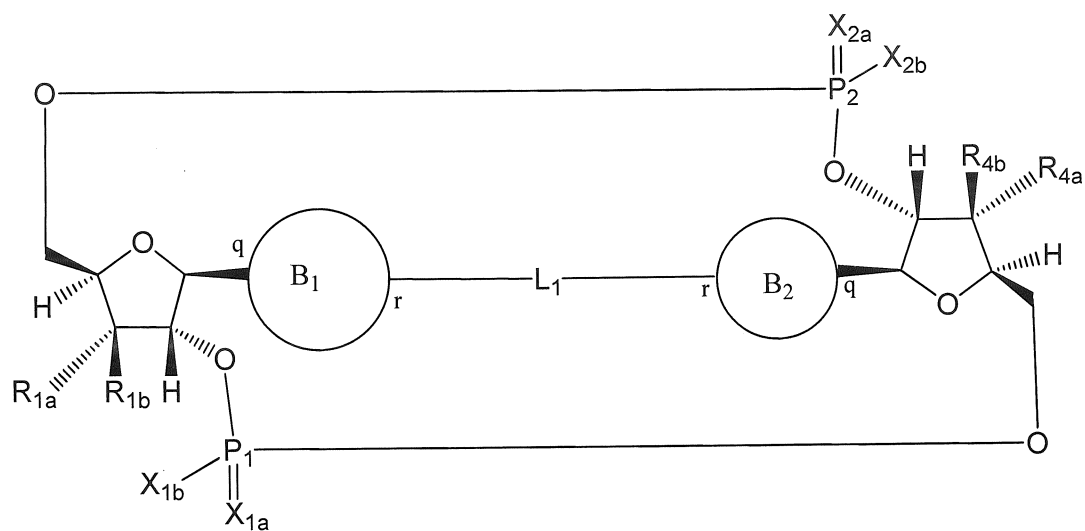
trong đó X_{10} và X_{14} độc lập được chọn từ liên kết, $-CH-$, hoặc $-CH_2-$, và trong đó, khi X_{10} hoặc X_{14} là liên kết, liên kết đó không phải là liên kết đôi;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:



, và , trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B_1 và B_2 được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (IV).

Theo các phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức (V):



(V)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{1a} và R_{1b} là $-H$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$ và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, và trong đó ít nhất một trong số R_{4a} và R_{4b} là $-H$;

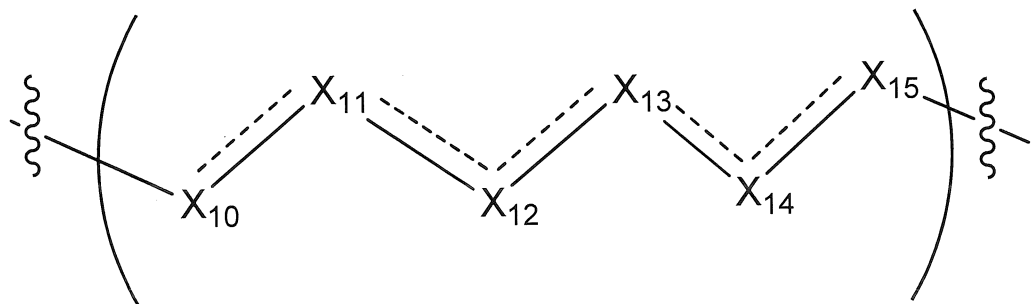
mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, và $-CH_2OC(O)OC_{1-6}alkyl$;

L_1 trong công thức (V) có chiều dài bốn, năm, hoặc sáu cacbon, và là

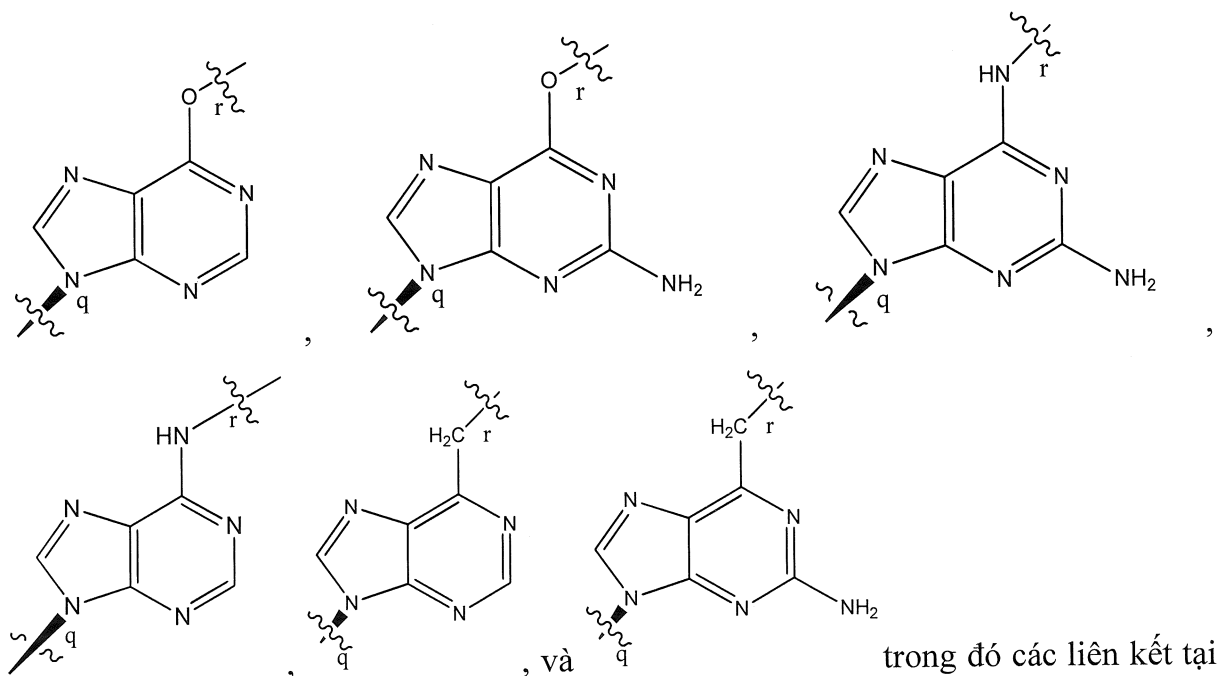


trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba và trong đó (i) 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba; hoặc (ii) 0, 1, hoặc 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về từng liên kết đôi là cis hoặc trans; và (iii) trong đó khi 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba, 0 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi; và (iv) trong đó, khi 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, các liên kết đôi này là các liên kết liền kề hoặc các liên kết xen kẽ;

trong đó X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} độc lập được chọn từ liên kết, $-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{CH}-$, trong đó $-\text{CH}_2-$ hoặc $-\text{CH}-$ không được thế hoặc được thế bởi (i) $-\text{OH}$, (ii) $-\text{F}$, (iii) $-\text{Cl}$, (iv) $-\text{NH}_2$, hoặc (v) $-\text{D}$, và khi X_{10} hoặc X_{15} là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi hoặc liên kết ba;

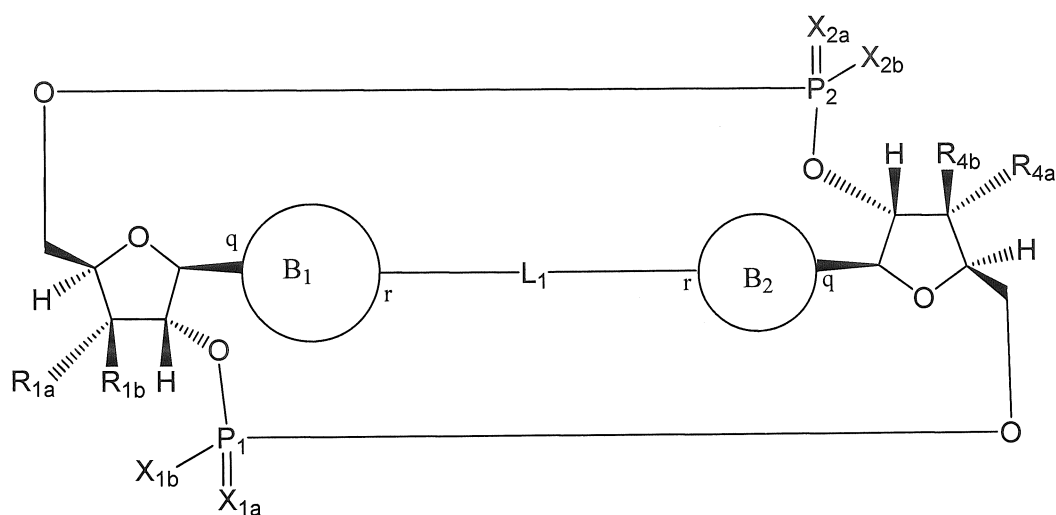
và trong đó hai thành viên liền kề bất kỳ của nhóm bao gồm X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} có thể tùy ý tạo thành, với các nguyên tử bổ sung, C_3 xycloalkyl hoặc C_3 heteroxycloalkyl, C_3 heteroxycloalkyl này bao gồm nguyên tử N hoặc O;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:



các điểm q và r trên B_1 và B_2 được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (V).

Theo các phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có Công thức (V):



(V)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$, trong đó cả R_{1a} và R_{1b} có thể đều không phải là $-F$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$ và $-F$, trong đó cả R_{4a} và R_{4b} có thể đều không phải là $-F$;

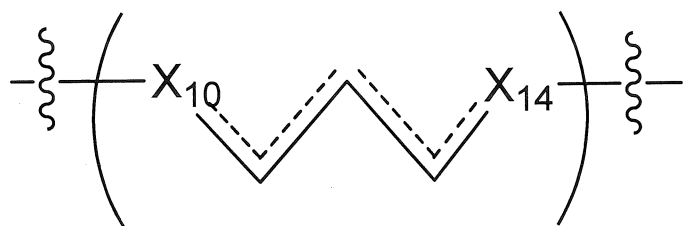
mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R ;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, và $-C(O)C_{1-6}alkyl$;

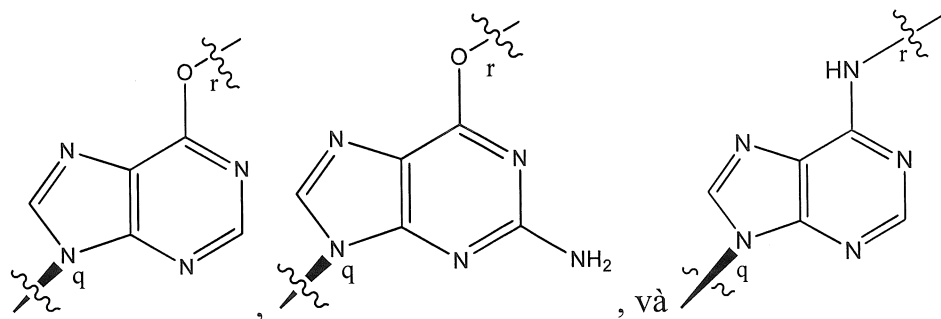
L_1 trong công thức (V) có chiều dài bốn hoặc năm cacbon, và là



trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi, và trong đó 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là *cis* hoặc *trans*;

trong đó X_{10} và X_{14} độc lập được chọn từ liên kết, $-\text{CH}-$, hoặc $-\text{CH}_2-$, và trong đó, khi X_{10} hoặc X_{14} là liên kết, liên kết đó không phải là liên kết đôi;

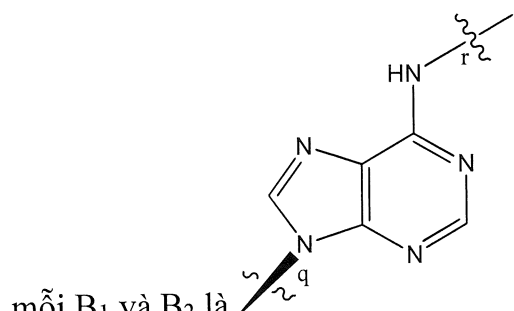
trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:



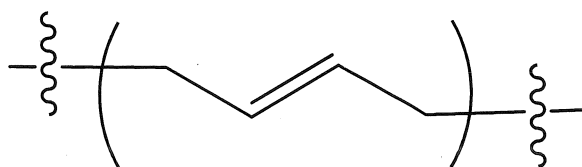
, và , trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B_1 và B_2 được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (V).

Theo một số phương án về các hợp chất và/hoặc muối được báo cáo trong các Công thức trên đây, (i) cấu hình hóa học lập thể của P_1 và P_2 đều là R, cấu hình hóa học lập thể của P_1 là R và P_2 là S, hoặc cấu hình hóa học lập thể của P_1 là S và P_2 là R; (ii) một sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là trans; và (iii) Z là $-\text{O}-$.

Các phương án khác về hợp chất và/hoặc muối như được báo cáo trong các Công thức trên đây có thể được tìm thấy trong các khía cạnh khác ở đây. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất hoặc muối được dụng trong đó mỗi gốc R_{1a} và R_{4a} là $-\text{F}$. Theo một số phương án, mỗi gốc R_{1b} và R_{4b} là $-\text{F}$. Theo một số phương án,

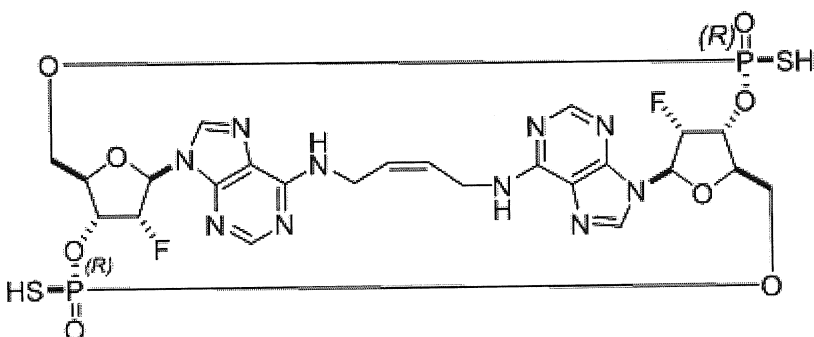
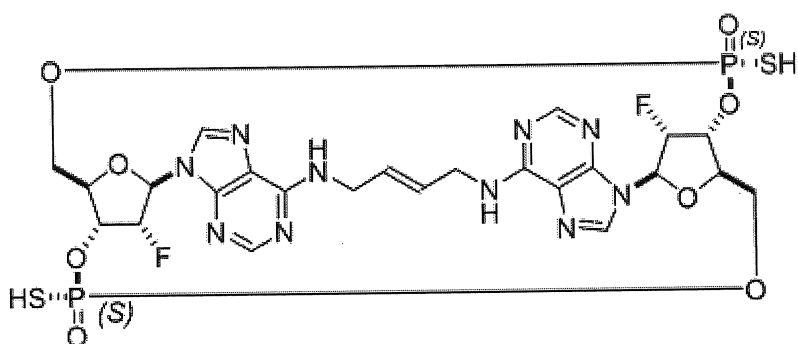
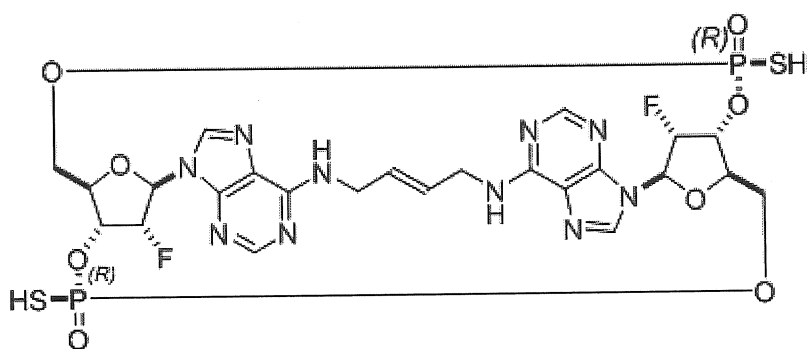
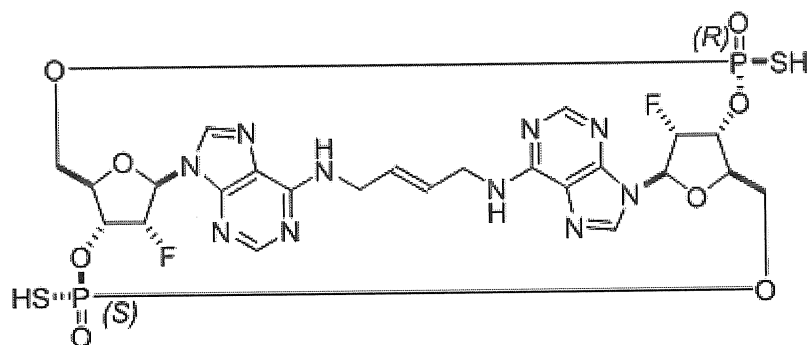


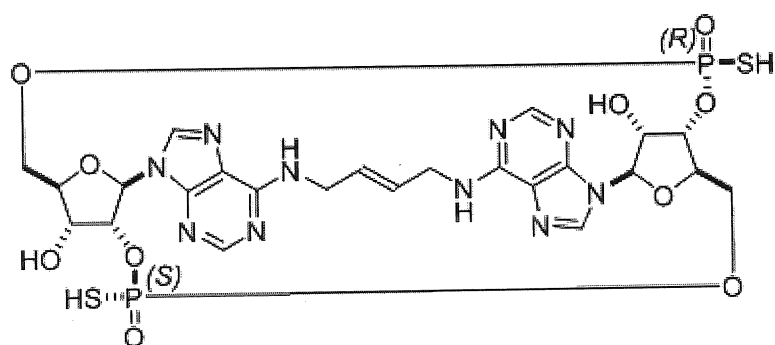
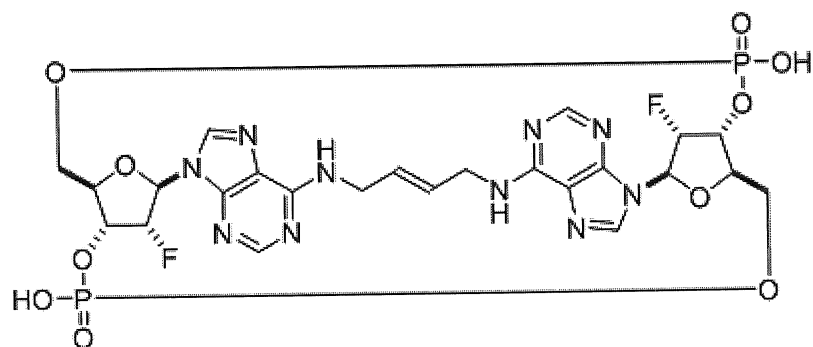
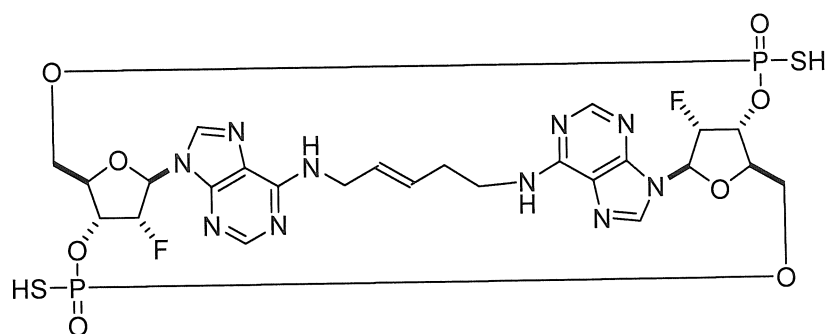
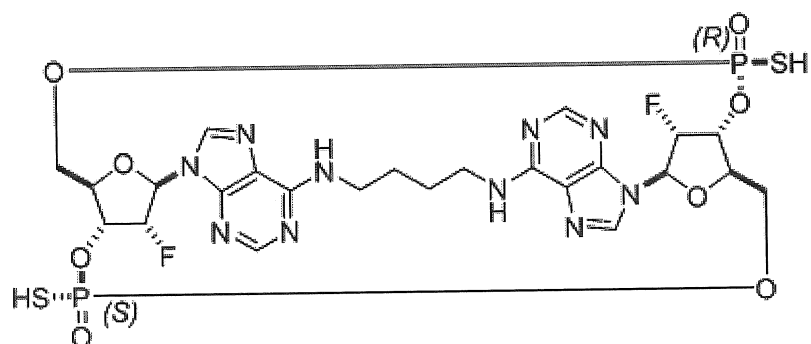
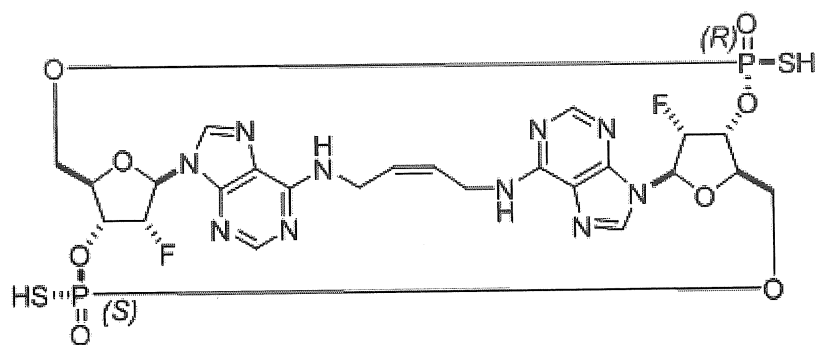
mỗi B_1 và B_2 là . Theo một số phương án, X_{1a} và X_{2a} đều là $=\text{O}$, và X_{1b} và X_{2b} đều là $-\text{SH}$. Theo một số phương án, L_1 là



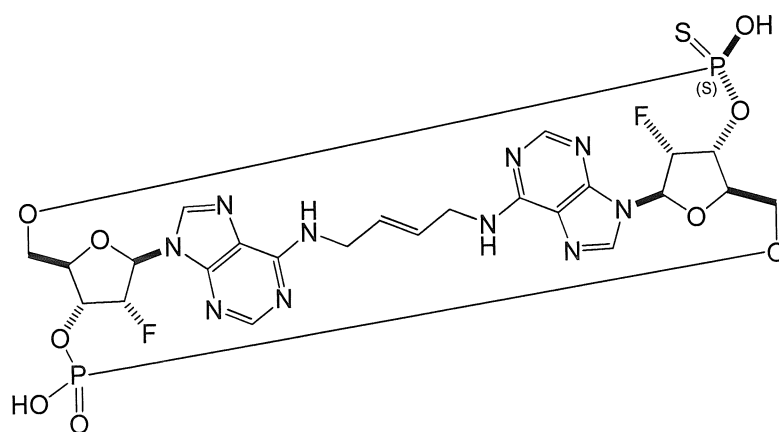
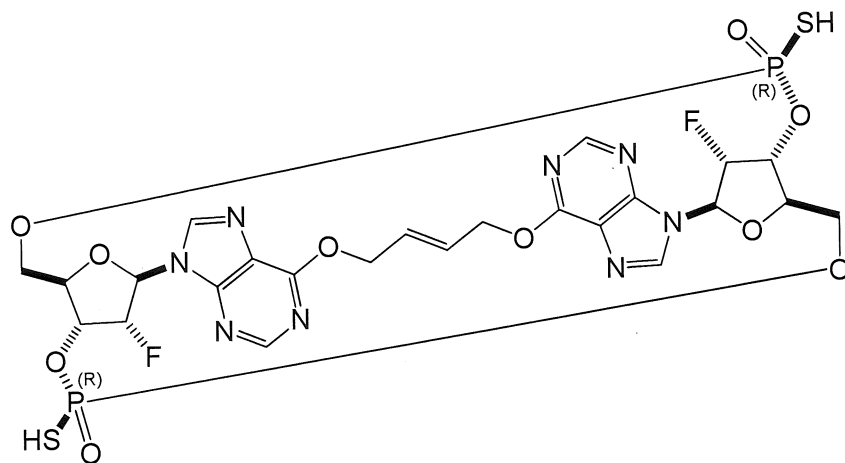
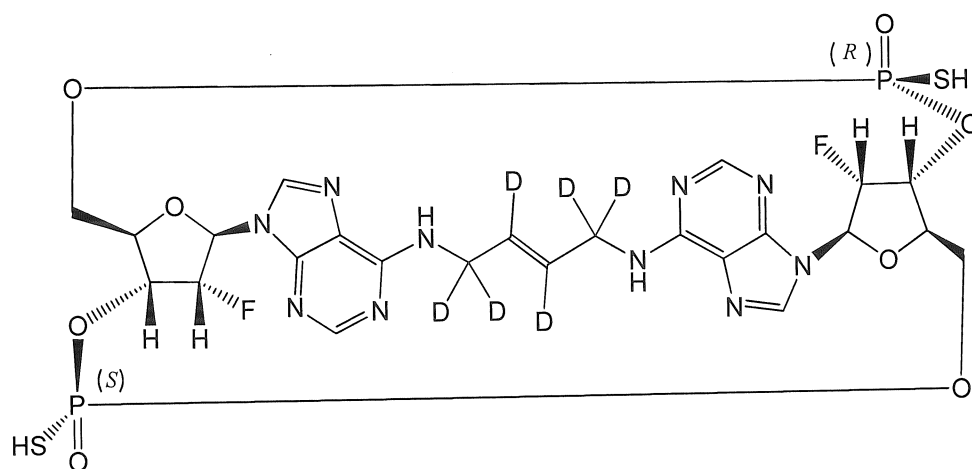
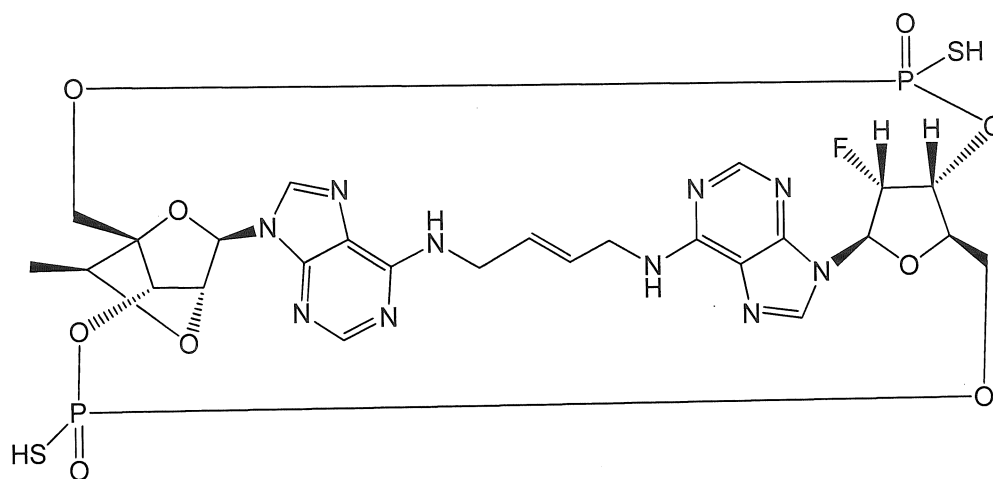
Theo một số phương án, cầu nối dài bốn cacbon. Theo một số phương án, cầu nối dài năm cacbon.

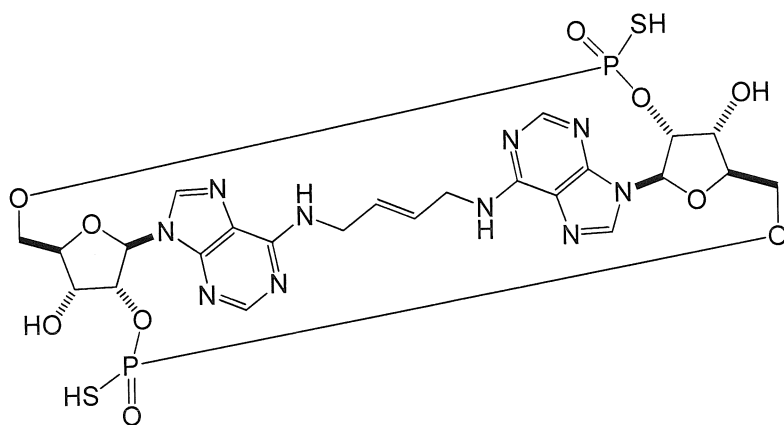
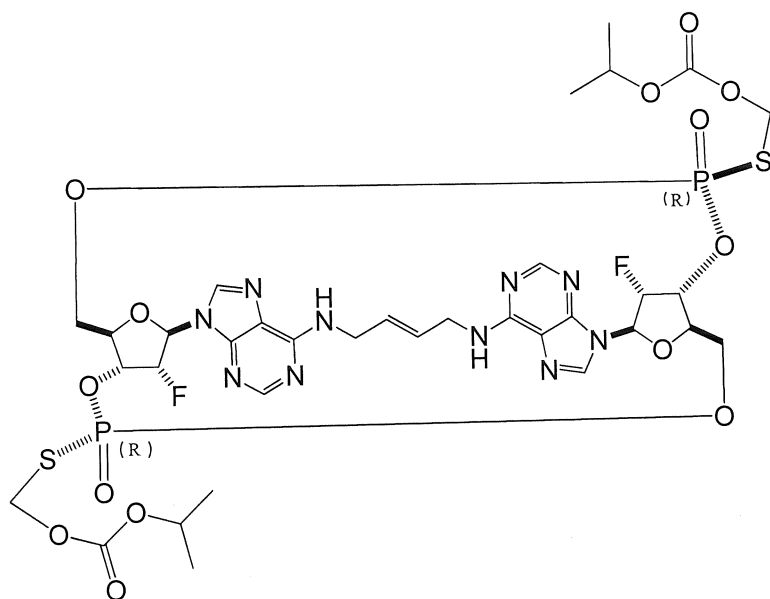
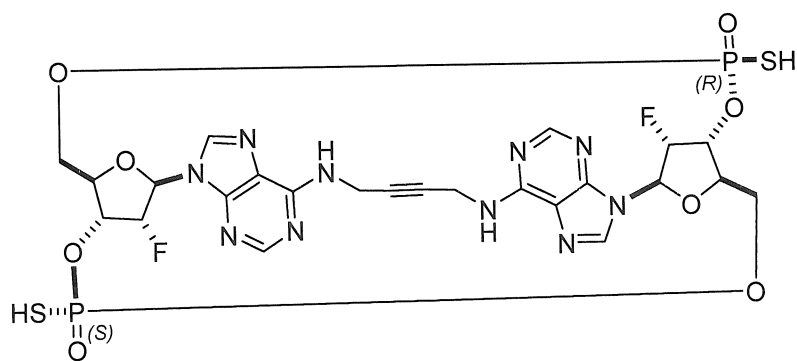
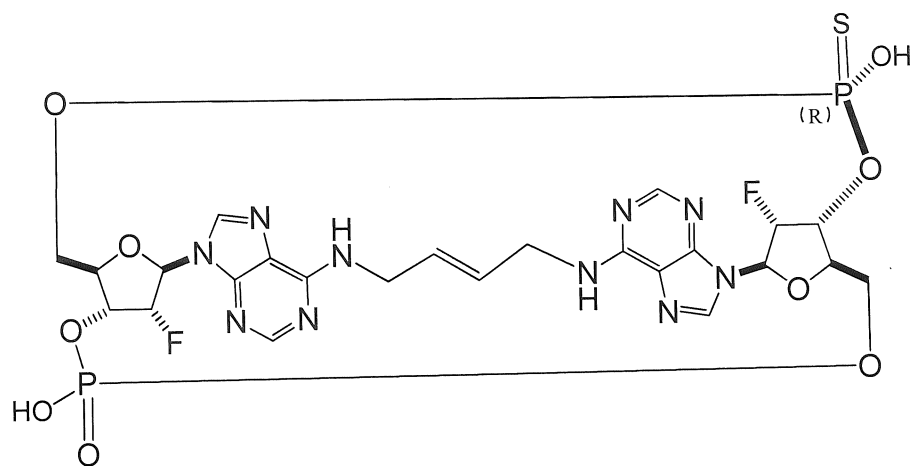
Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

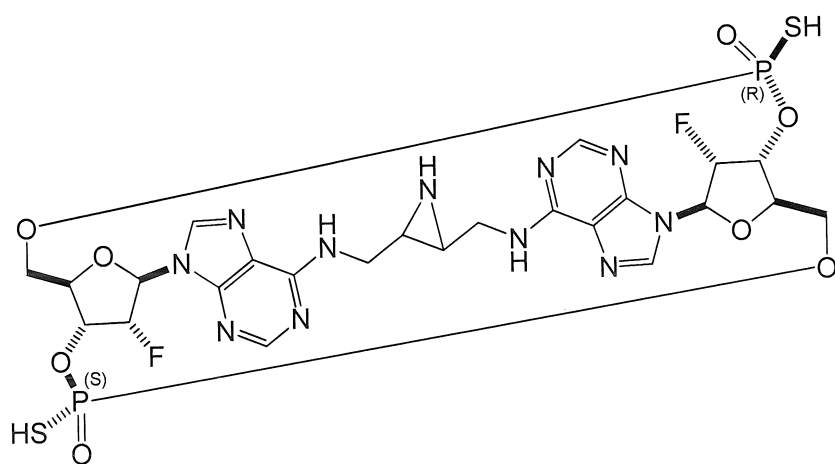
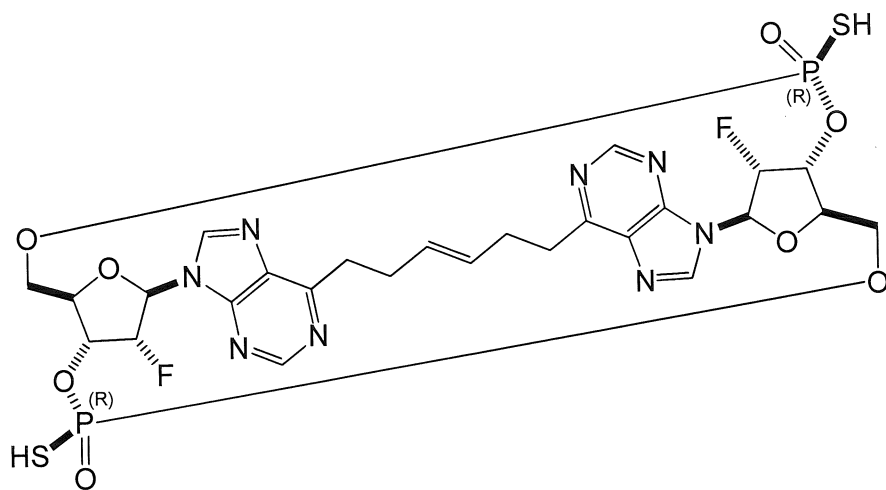
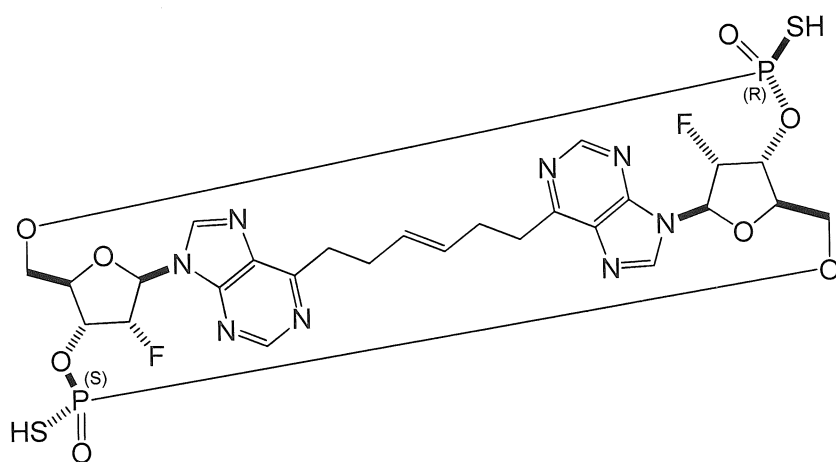
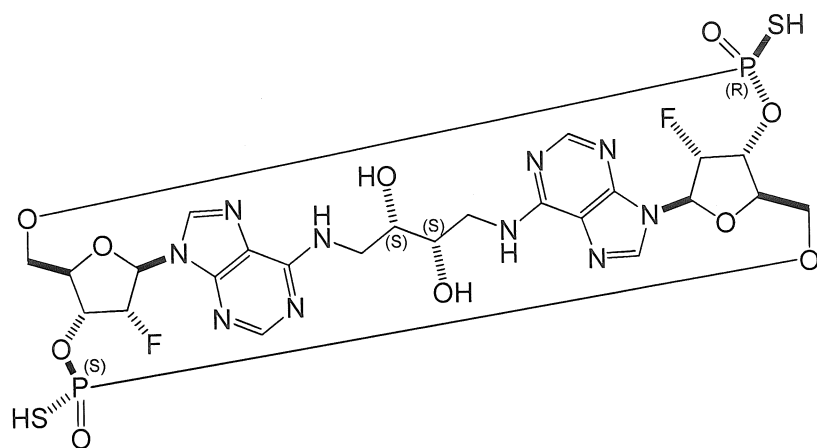


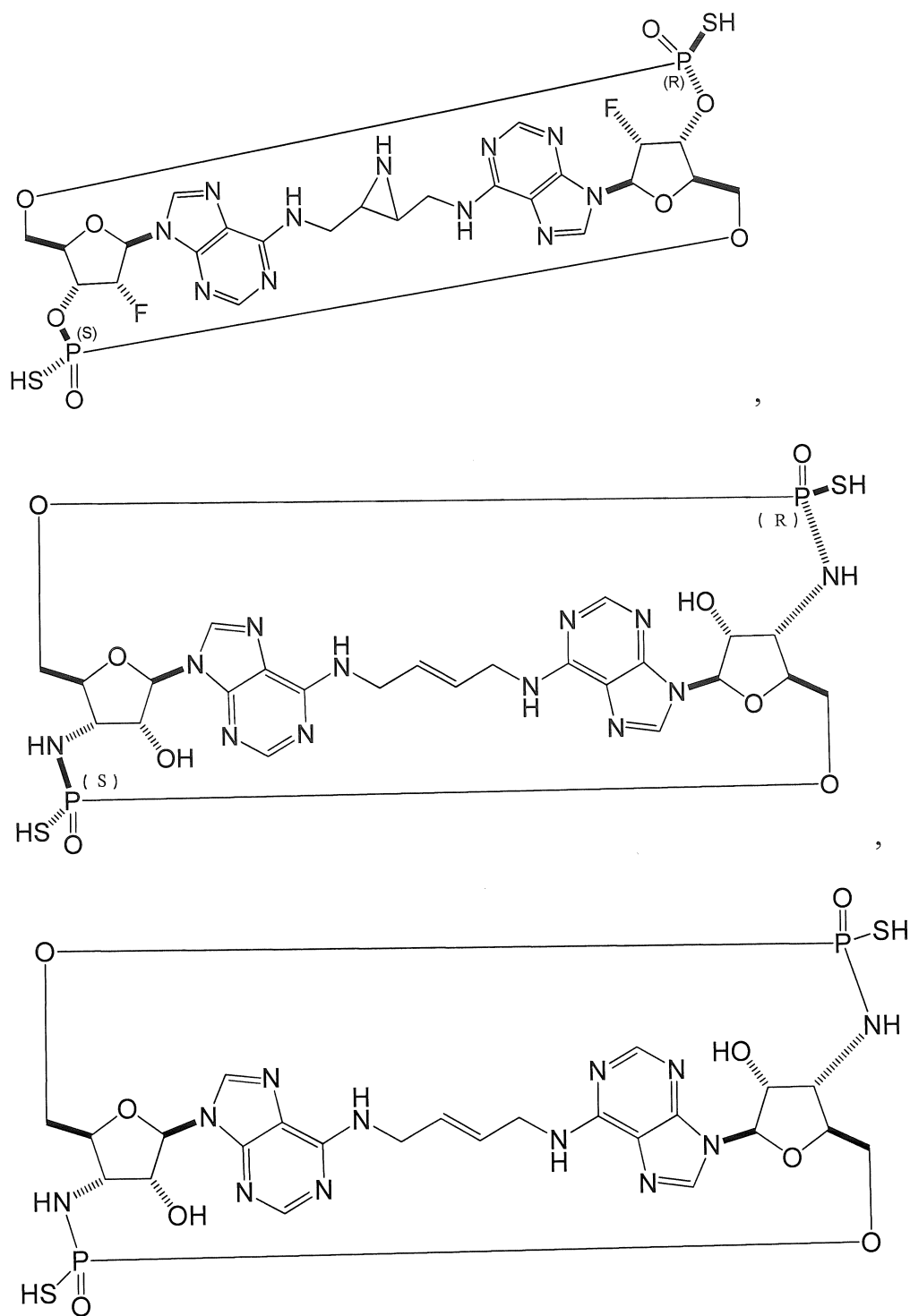








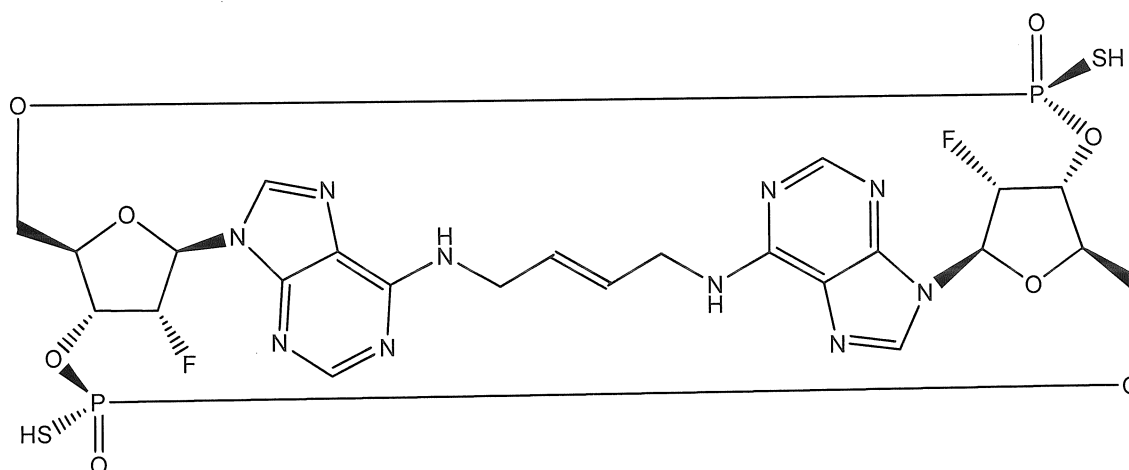




hoặc muối được dùng của chúng.

Theo các phương án, sáng chế đề xuất hợp chất hoặc muối được dùng có một hoặc nhiều trong số (i) giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 micromol trong phân tích báo cáo tế bào biểu hiện biến thể di truyền STING HAQ; (ii) giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING AQ người; (iii) giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING WT người; và (iv) giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING REF

người. Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có cấu trúc sau đây:



hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất muối dược dụng của hợp chất được đề cập ở đây, trong đó muối này là muối diamoni. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các hợp chất được đề cập ở đây dưới dạng muối trietyl amin (TEA). Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối như được đề cập ở đây và tá dược dược dụng.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân hợp chất, muối dược dụng, hoặc dược phẩm như được đề cập ở đây.

Việc sử dụng hợp chất hoặc muối dược dụng của chúng như được đề cập ở đây để bào chế dược phẩm điều trị bệnh ung thư.

Theo các phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất, muối dược dụng, hoặc dược phẩm được đề cập ở đây để điều trị bệnh ung thư.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước xác định đối tượng bị bệnh ung thư có thể điều trị được bằng hợp chất, muối dược dụng, hoặc dược phẩm được đề cập ở đây; và cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu dược dụng của hợp chất, muối dược dụng hoặc dược phẩm mà bệnh ung thư đã được xác định là điều trị được bằng chúng.

Theo một số phương án, đối tượng này được xác định là bị bệnh ung thư có thể điều trị được bằng hợp chất, muối dược dụng hoặc dược phẩm được đề cập ở đây bởi sự có mặt của alen biến thể REF STING ở bệnh nhân này.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen REF STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, muối được dụng hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen WT STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, muối được dụng hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen AQ STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, muối được dụng hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen HAQ STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, muối được dụng hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm u lympho, u hắc tố, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, bệnh bạch cầu tủy cấp tính, bệnh ung thư ruột kết, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tụy, ung thư thận, và u thần kinh đệm. Theo một số phương án, bệnh ung thư là di căn.

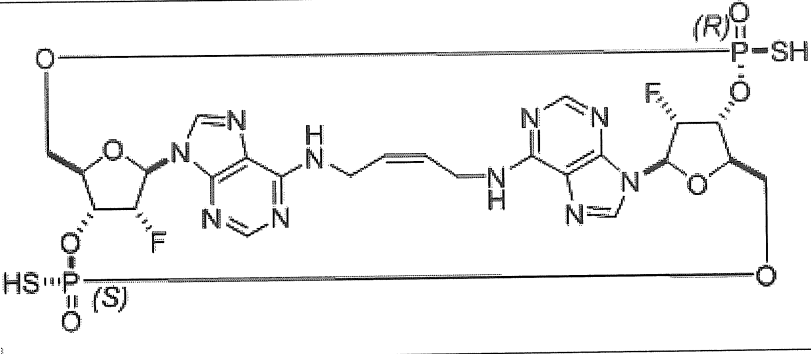
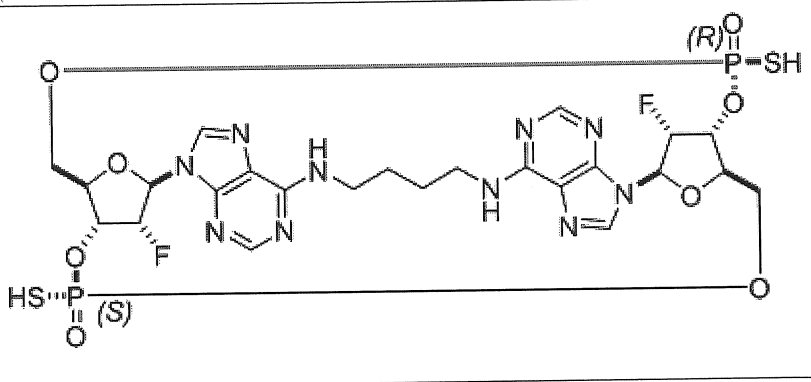
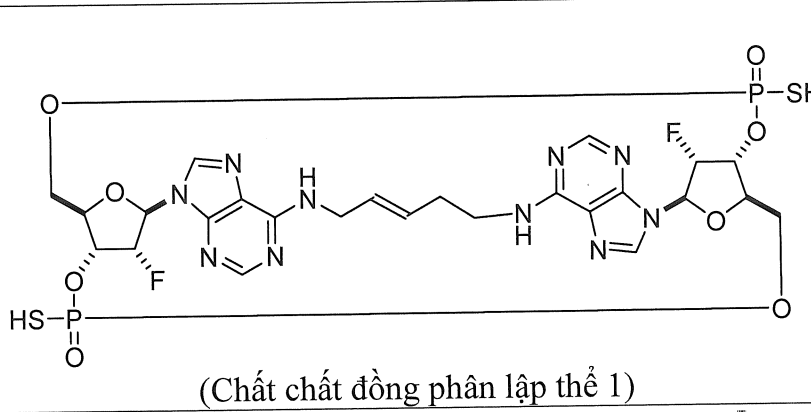
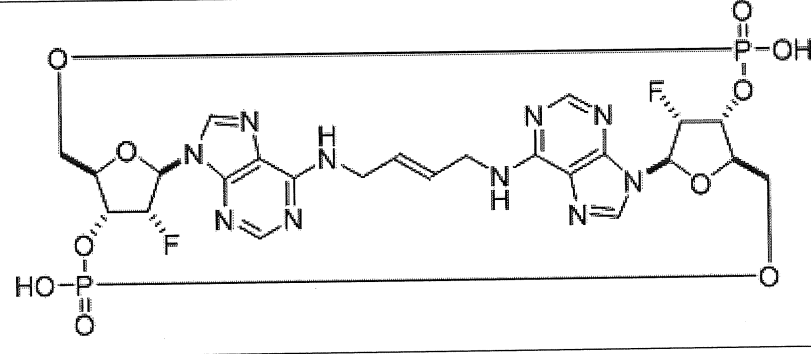
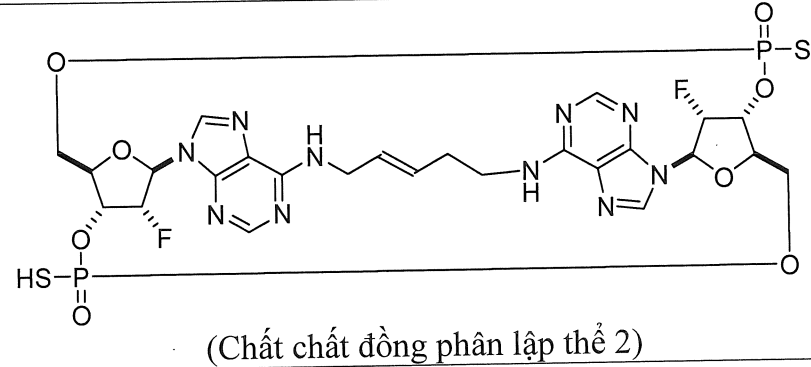
Theo một số phương án về các hợp chất có các công thức được thể hiện ở đây, một trong số các liên kết ở L_1 là liên kết đôi. Theo các phương án khác, liên kết đôi này có hình học trans. Theo các phương án khác, L_1 là no. Theo các phương án cụ thể, L_1 bao gồm năm nguyên tử cacbon. Theo các phương án khác, L_1 bao gồm 4 nguyên tử cacbon.

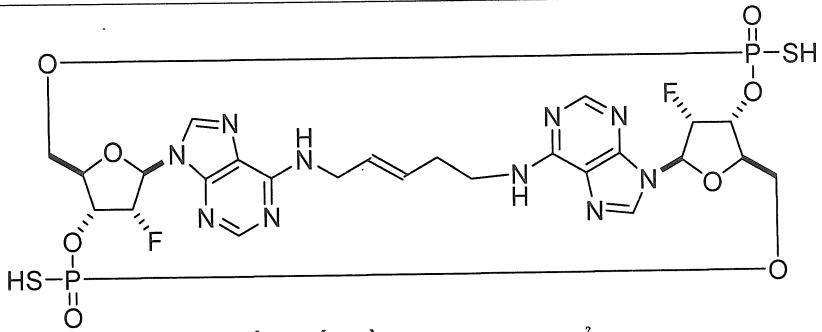
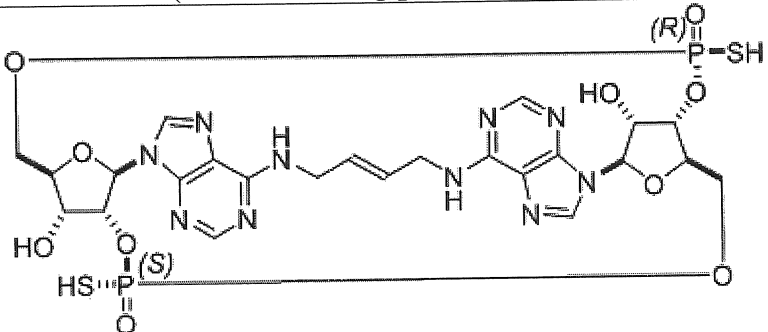
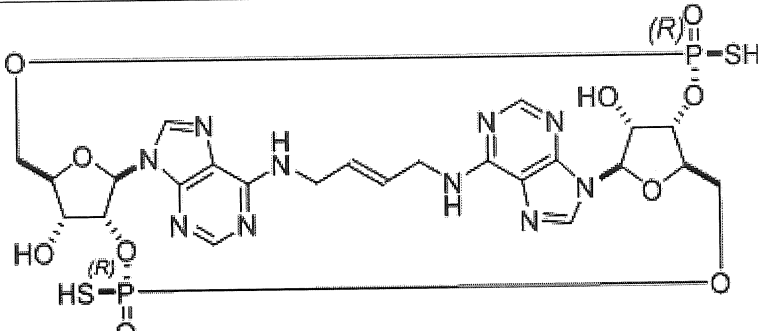
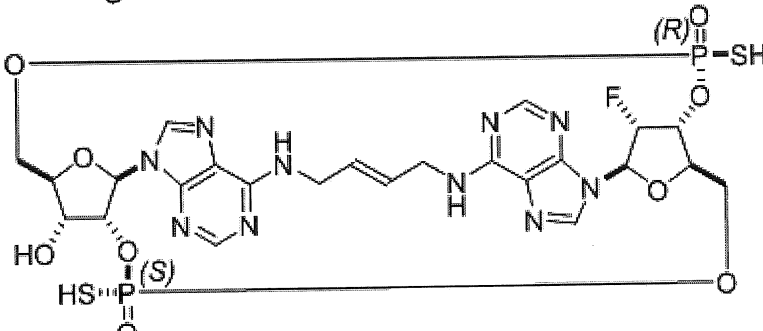
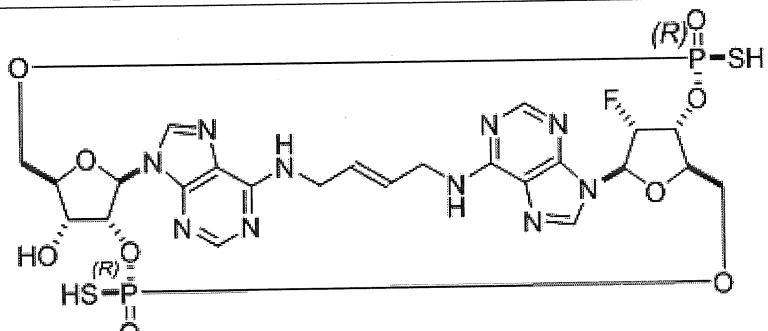
Theo các phương án, sáng chế còn đề xuất hỗn hợp của các hợp chất như được đề cập ở đây, bao gồm các hỗn hợp chất đồng phân lập thể của các hợp chất này. Ví dụ, hỗn hợp có thể được tạo ra từ Hợp chất 11 và Hợp chất 12, hoặc hỗn hợp có thể được tạo ra từ Hợp chất 2 và Hợp chất 4. Dĩ nhiên, đây là các ví dụ không giới hạn và các hỗn hợp khác là có thể.

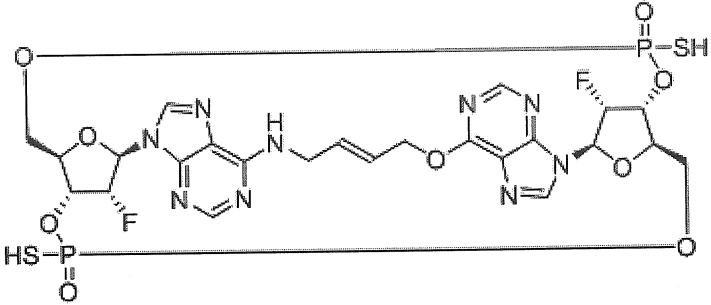
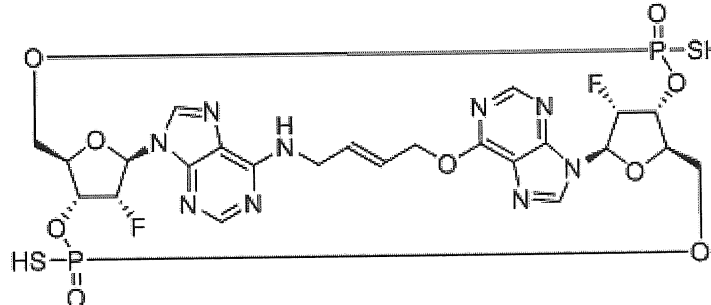
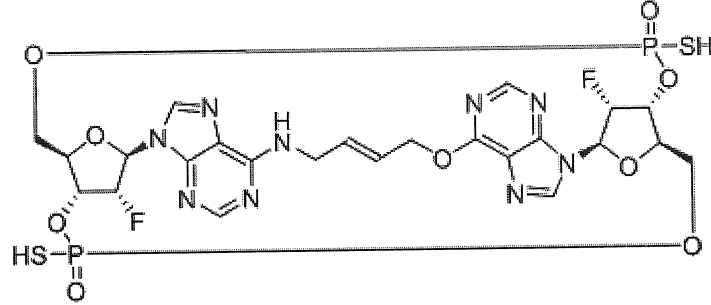
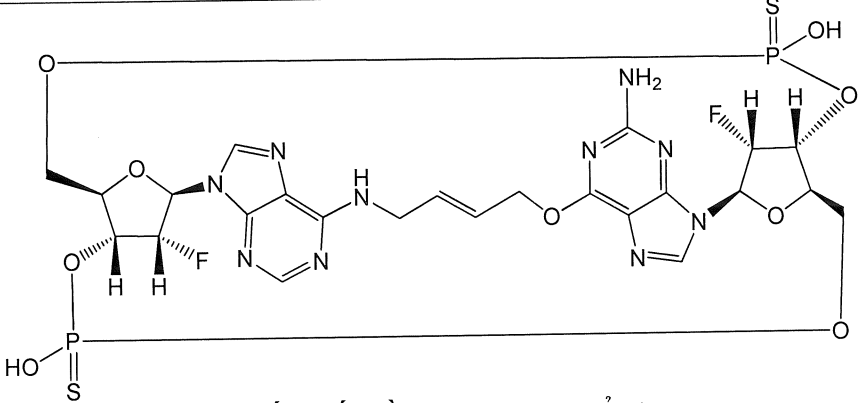
Các phương pháp cụ thể được nêu trong Bảng 3 dưới đây.

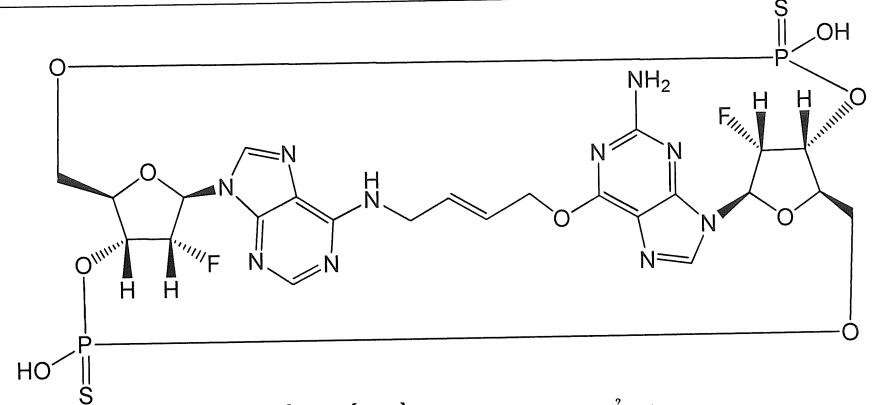
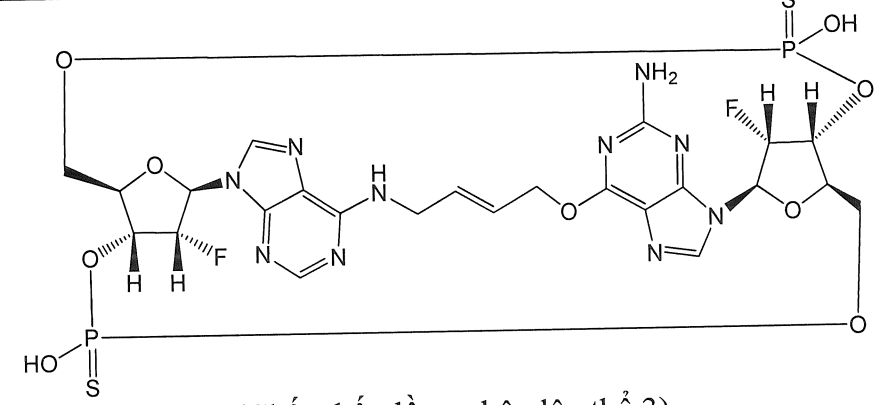
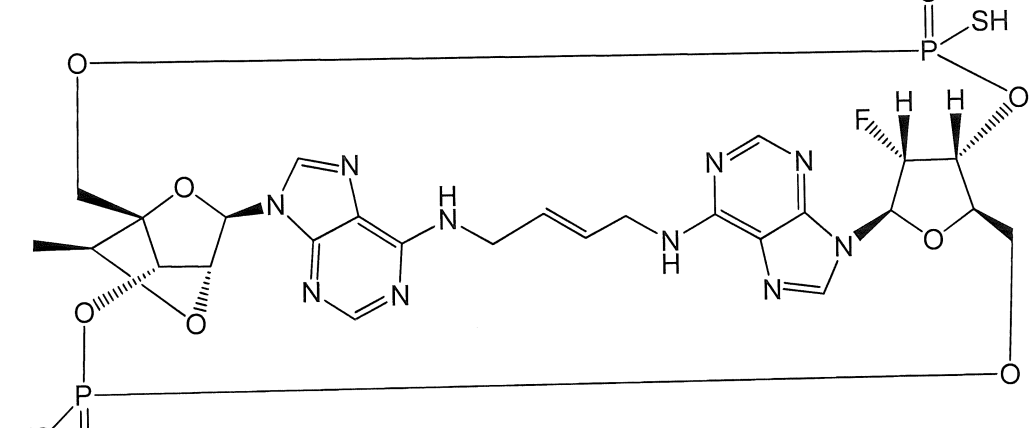
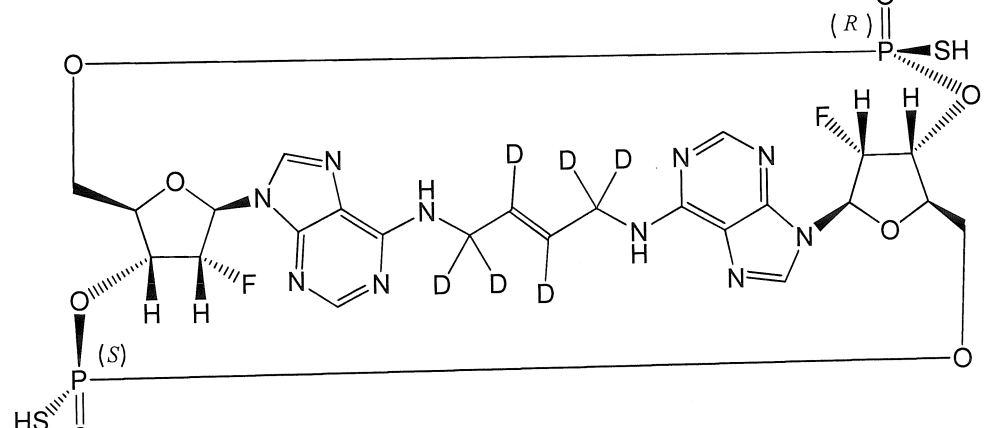
Bảng 3.

Hợp chất số	Cấu tạo
1	
2	
3	
4	

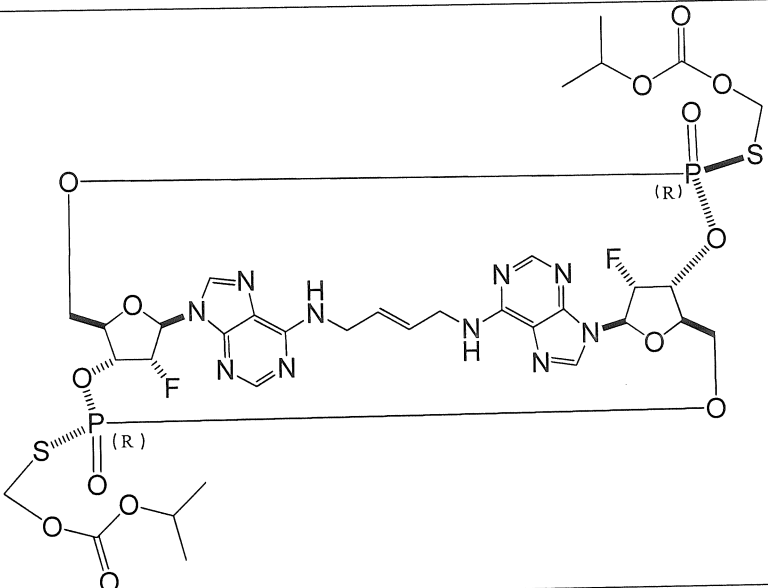
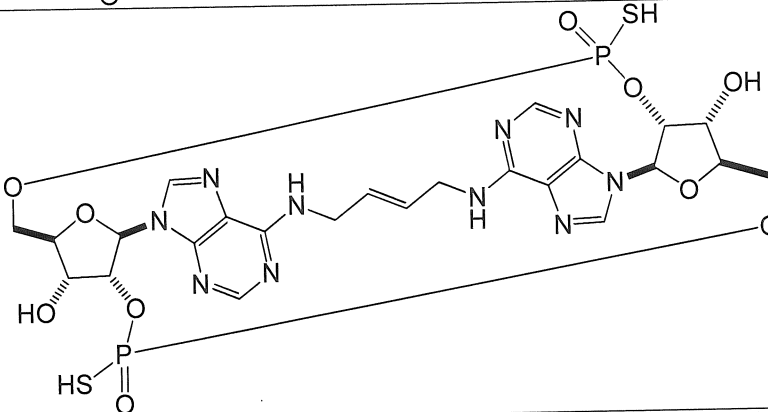
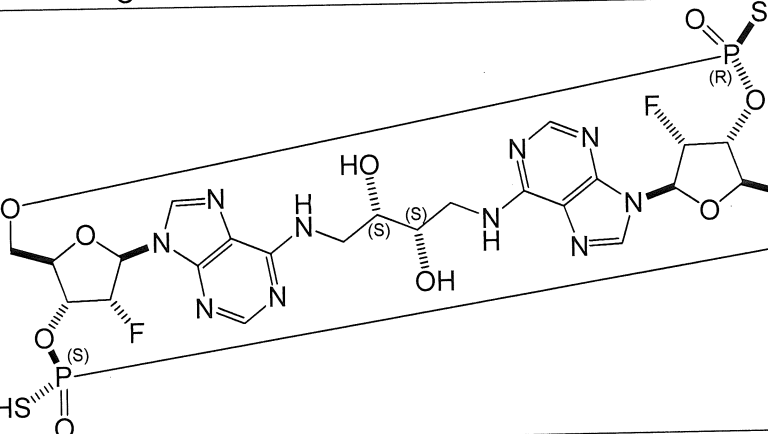
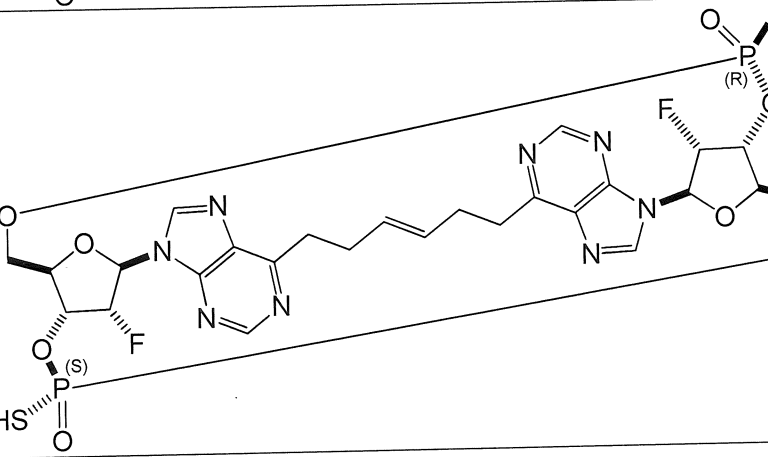
5	
6	
8	 (Chất chất đồng phân lập thể 1)
9	
11	 (Chất chất đồng phân lập thể 2)

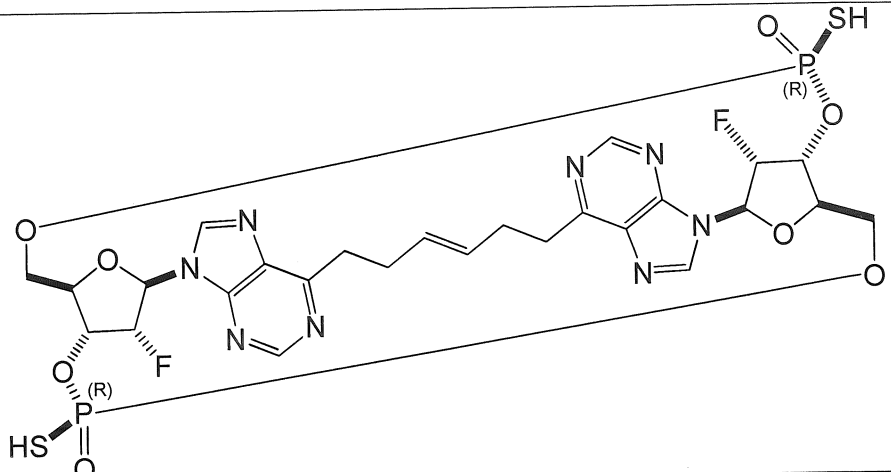
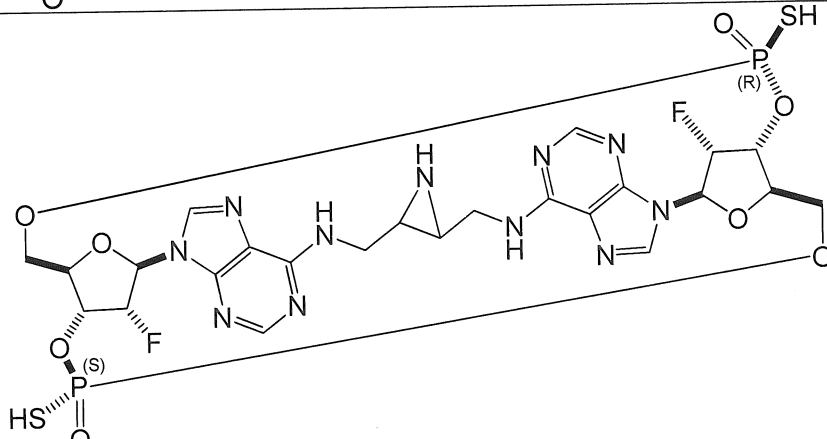
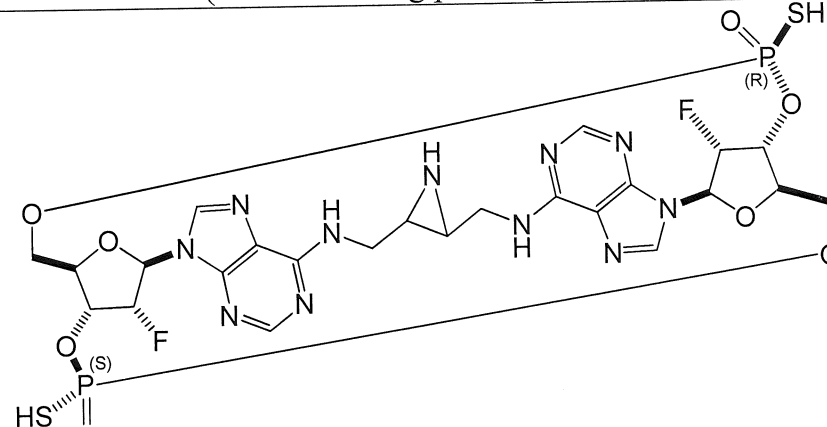
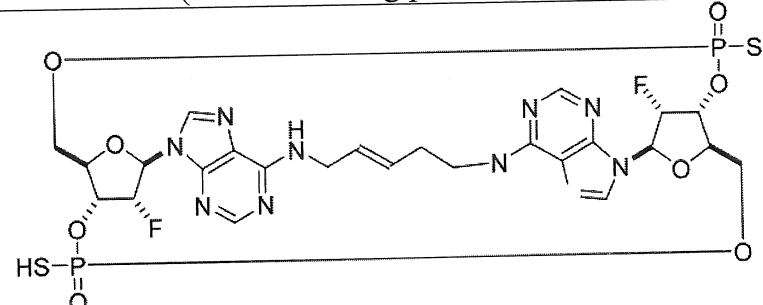
12	 (Chất chất đồng phân lập thể 3)
13	
14	
15	
16	

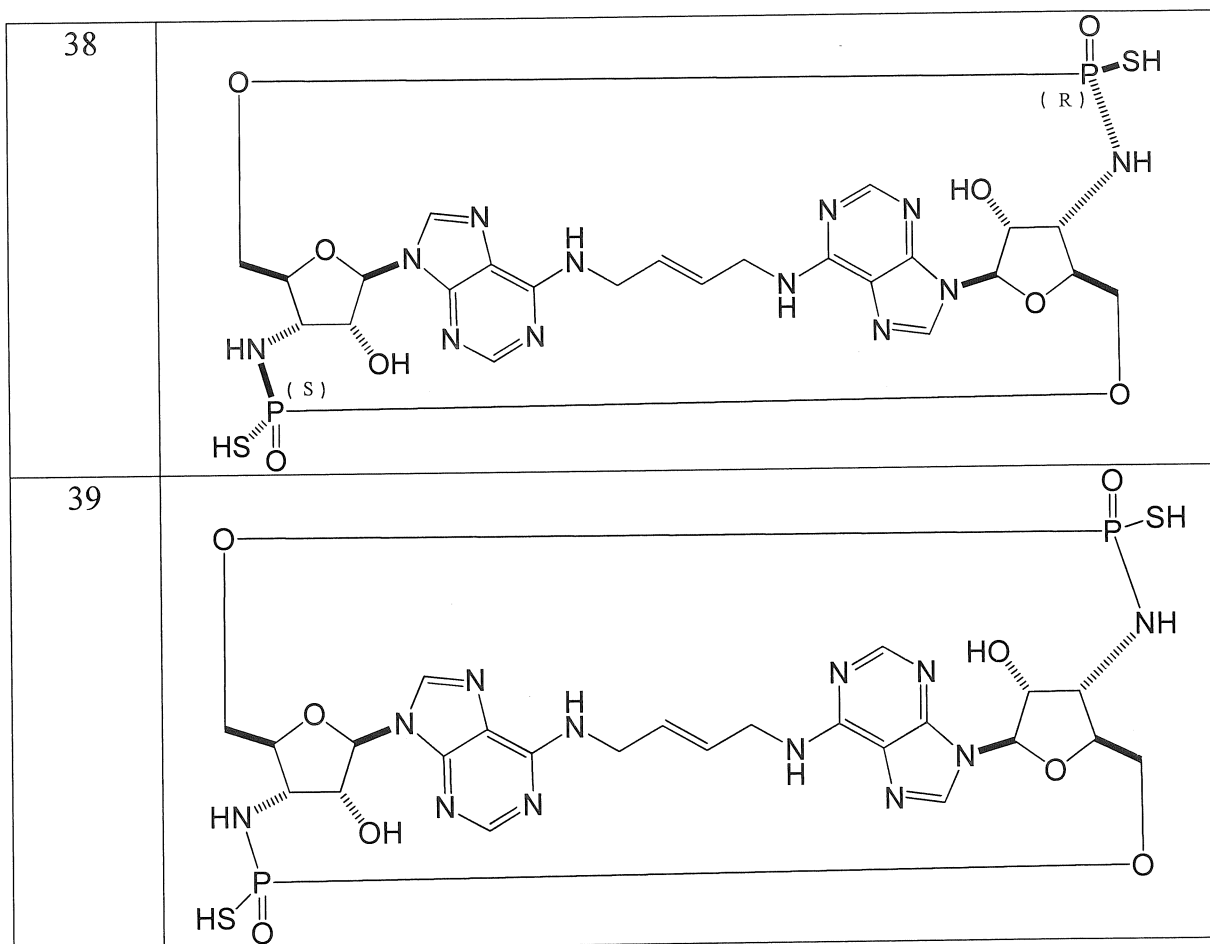
18	 (Chất chất đồng phân lập thể 1)
19	 (Chất chất đồng phân lập thể 2)
20	 (Chất chất đồng phân lập thể 3)
21	 (Chất chất đồng phân lập thể 1)

22	 (Chất chất đồng phân lập thể 2)
23	 (Chất chất đồng phân lập thể 3)
24	 (Chất chất đồng phân lập thể 4)
25	 (Chất chất đồng phân lập thể 5)

26	Chemical structure 26: A dimeric molecule consisting of two deoxyribose units linked by a pyrimidine-pyrimidine base pair. The left deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (R). The right deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (R). The two deoxyribose units are connected by a pyrimidine-pyrimidine base pair via their N1 and N3 positions. The phosphate groups are linked by a diphosphate bridge.
27	Chemical structure 27: A dimeric molecule consisting of two deoxyribose units linked by a pyrimidine-pyrimidine base pair. The left deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (S). The right deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (S). The two deoxyribose units are connected by a pyrimidine-pyrimidine base pair via their N1 and N3 positions. The phosphate groups are linked by a diphosphate bridge.
28	Chemical structure 28: A dimeric molecule consisting of two deoxyribose units linked by a pyrimidine-pyrimidine base pair. The left deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (R). The right deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (R). The two deoxyribose units are connected by a pyrimidine-pyrimidine base pair via their N1 and N3 positions. The phosphate groups are linked by a diphosphate bridge.
29	Chemical structure 29: A dimeric molecule consisting of two deoxyribose units linked by a pyrimidine-pyrimidine base pair. The left deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (S). The right deoxyribose is substituted with a fluorine atom at the 2' position and a phosphate group at the 3' position, labeled (R). The two deoxyribose units are connected by a pyrimidine-pyrimidine base pair via their N1 and N3 positions. The phosphate groups are linked by a diphosphate bridge.

30	
31	
32	
33	

34	
35	 (Chất chất đồng phân lập thể 1)
36	 (Chất chất đồng phân lập thể 2)
37	 (Chất chất đồng phân lập thể 4)

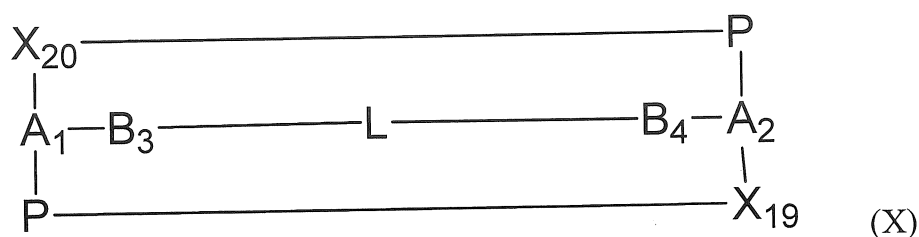


Trong Bảng trên đây, Hợp chất 8, 11, và 12 được vẽ với cùng công thức cấu tạo và liên quan đến ba chất đồng phân lập thể riêng rẽ. Tuy nhiên, Chủ đơn lưu ý rằng tính bất đối xứng phospho của Hợp chất 8 không nhất thiết phải giống tính bất đối xứng phospho cho các hợp chất khác được gắn nhãn “Chất đồng phân lập thể 1,” như, ví dụ, Hợp chất 21. Điều tương tự cũng đúng với các chất đồng phân lập thể khác.

Các phương án có thể liên quan đến các cầu nối C₄-C₆ có thể được liên kết cộng hóa trị tại một đầu với các bazơ purin hoặc pyrimidin mà tạo thành một phần của dinucleotit dạng vòng. Theo một phương án, các cầu nối này là các cầu nối buten, penten hoặc hexen được liên kết tại một đầu với các bazơ purin. Theo phương án khác, các cầu nối này là các cầu nối buten được liên kết tại một đầu với các bazơ purin; theo phương án khác, các cầu nối này là các cầu nối transbuten với liên kết đôi được định vị giữa hai cacbon trung tâm.

Các phương án được đánh số sau đây là minh họa về việc sử dụng các cầu nối C₄-C₆ này:

1. Hợp chất có Công thức (X):



hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

A₁ và A₂ là các gốc đường và có thể là giống nhau hoặc khác nhau;

B₃ và B₄ là các bazơ purin hoặc pyrimidin mà có thể là giống nhau hoặc khác nhau và tạo thành các nucleotit với lần lượt A₁ và A₂;

L là cầu nối alkyl;

X₁₉ và X₂₀ là giống nhau hoặc khác nhau và được chọn từ nhóm bao gồm –O–, –CH–, –NH–, và –S–, trong đó –CH– và –NH– có thể được thế hoặc không được thế.

2. Hợp chất hoặc muối được dụng theo phương án được đánh số 1, trong đó –CH– và –NH– của X₁₉ và X₂₀ có thể được thế bằng C₁₋₆ alkyl.

3. Hợp chất hoặc muối được dụng theo phương án được đánh số 1, trong đó L là buten, penten, hoặc hexan.

4. Hợp chất hoặc muối được dụng theo phương án được đánh số 3, trong đó L là cầu nối transbuten với liên kết đôi tại tâm của nó.

Hợp chất hoặc muối được dụng theo các phương án được đánh số này có thể là hữu dụng, ví dụ, để điều trị bệnh ung thư. A₁, A₂, B₃, và B₄ có thể còn được thế bằng, ví dụ, hydroxyl, halogen, hoặc metoxy. Mỗi phospho trong Công thức (X) có thể được thế, ví dụ, bằng –SH, –OH, =O, hoặc =S tới khi hóa trị của nó đã được thỏa mãn.

Các ví dụ về các chất tương tự di-nucleotit dạng vòng có thể có lợi từ các cầu nối theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất được xác định trong các tài liệu US 2014/0205653 A1; US 2014/0329889 A1 ; US 2014/0341976 A1; US 2015/0056224 A1; US 2016/0362441 A1; US 2017/0158724 A1; US 2017/044206 A1; US 5,547,941; US 7,569,555 B2; US 7,592,326 B2; US 7,709,458 B2; US 9,549,944 B2; WO 2009/133560 A1; WO 2015/074145 A1; WO 2015/077354 A1; WO 2015/185565 A1; WO 2016/100261 A1; WO 2016/120305 A1; WO 2016/145102 A1;

WO 2017/027645 A1; WO 2017/027646 A1; WO 2017/075477 A1; WO 2017/093933 A1; WO 2017/123657 A1; WO 2017/175156 A1; EP 1740,192 B1; CN 102199183 A; Corrales, L. *et al.*, “Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity,” *Cell Reports*, **11**: 1018-1030 (2015); và Lioux, T. *et al.*, “Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Cyclic Adenosine-Inosine Monophosphate (cAIMP) Analogs That Activate Stimulator of Interferon Genes (STING),” *J. Med. Chem.*, **59**: 10253-10267 (2016). Tất cả các tài liệu này, bao gồm các hợp chất trong đó, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn; nếu thành phần bất kỳ trong số các tài liệu bất kỳ mâu thuẫn với hoặc theo cách khác không thống nhất với điều bất kỳ trong bản mô tả này, thì bản mô tả này sẽ kiểm soát.

Theo một số phương án, hợp chất như được đề cập ở đây được đề xuất dưới dạng axit tự do. Theo một số phương án, hợp chất được đề xuất dưới dạng muối NH_4 hoặc dưới dạng muối triethyl amin (TEA).

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của hợp chất được đề cập ở đây, hoặc muối được dụng của chúng, như được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, hợp chất này được sử dụng dưới dạng axit tự do. Theo một số phương án, hợp chất này được sử dụng dưới dạng muối diamoni (NH_4). Dược phẩm chứa hợp chất có Công thức I, Công thức II, Công thức III, Công thức IV, Công thức V, Bảng 3, hoặc muối được dụng của chúng, cùng với tá dược được dụng, được dự tính. Theo các phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có Công thức I trong đó n là 1; hình học về liên kết đôi là trans; mỗi X_1 và X_2 là SH; hóa học lập thể tại P_1 là S; và hóa học lập thể tại P_2 là R; hoặc muối được dụng của chúng.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc dược phẩm, như được đề cập ở đây. Các bệnh ung thư được điều trị như được đề cập ở đây có thể là ung thư di căn. Chúng có thể được chọn từ, ví dụ, u lympho, u hắc tố, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, bệnh bạch cầu tủy cấp tính, bệnh ung thư ruột kết, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tụy, ung thư thận, và u thần kinh đệm. Việc sử dụng hợp chất, muối, và dược phẩm để điều trị bệnh ung thư và/hoặc bào chế thuốc

để điều trị bệnh ung thư cũng được dự tính.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước xác định đối tượng bị bệnh ung thư có thể điều trị được bằng hợp chất, muối được dụng, hoặc được phẩm như được đề cập ở đây; và cho đối tượng này dùng hợp chất, muối được dụng hoặc được phẩm mà bệnh nhân đã được xác định là điều trị được bằng chúng. Theo một số phương án, đối tượng này được xác định là bị bệnh ung thư có thể điều trị được bằng hợp chất, muối được dụng hoặc được phẩm như được đề cập ở đây bởi sự có mặt của alen biến thể REF STING người ở bệnh nhân này.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen REF STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, muối được dụng của chúng, hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen WT STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen AQ STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, hoặc muối được dụng của chúng, hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có alen HAQ STING bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng hợp chất, muối được dụng của chúng, hoặc được phẩm như được đề cập ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện quy trình tổng hợp Hợp chất 1a và Hợp chất 2a.

FIG. 2A và FIG. 2B thể hiện quy trình tổng hợp thay thế của Hợp chất 1 và Hợp chất 1a. Quy trình tổng hợp thay thế này cũng được thể hiện trên FIG. 2C đến FIG. 2E.

FIG. 3 thể hiện phổ ký ^1H NMR đối với Hợp chất 1.

FIG. 4A, FIG. 4B, và FIG. 4C thể hiện các kết quả tinh thể học tia X (các hình vẽ ORTEP) cho lần lượt tinh thể bất đối xứng của Hợp chất 1, phân tử thứ nhất từ tinh thể bất đối xứng này, và phân tử thứ hai từ tinh thể bất đối xứng này.

FIG. 4D thể hiện các kết quả tinh thể học tia X (hình vẽ ORTEP) cho tinh thể của

Hợp chất 2.

FIG. 5A và FIG. 5B thể hiện quy trình tổng hợp đối với các Hợp chất 18, 19, và 20.

FIG. 6 thể hiện bản đồ vector biểu hiện cho WT STING (pLenti-WT human STING-Puro).

FIG. 7 và FIG. 8 cùng với Ví dụ 108 và thể hiện hoạt tính chữa bệnh của Hợp chất 1a trong mô hình khối u kép CT26.

FIG. 9 cùng với Ví dụ 109 và thể hiện biểu đồ thể tích khối u cho các khối u được điều trị và đường cong sống sót.

FIG. 10 cùng với Ví dụ 110 và thể hiện biểu đồ thể tích khối u cho các khối u được điều trị và đường cong sống sót.

FIG. 11 thể hiện hình ảnh cấu trúc tinh thể tia X của WT STING người trong phức hợp với Hợp chất 1.

FIG. 12 thể hiện đầu tận cùng C của REF STING người trong phức hợp với Hợp chất 1.

FIG. 13 thể hiện ví dụ về quy trình tổng hợp Hợp chất 38 và Hợp chất 39.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các hợp chất mà có thể là hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư. Các hợp chất này có thể hoạt hóa yếu tố ức chế của các gen interferon (STING).

Theo một số phương án, hợp chất được đề xuất dưới dạng axit tự do. Theo một số phương án, hợp chất được đề xuất dưới dạng, ví dụ, muối NH_4 hoặc muối TEA. Tham chiếu đến số của hợp chất theo sau bởi “a” sẽ chỉ ra muối diamoni của hợp chất đã cho. Ví dụ, “Hợp chất 1a” đề cập đến muối diamoni của Hợp chất 1.

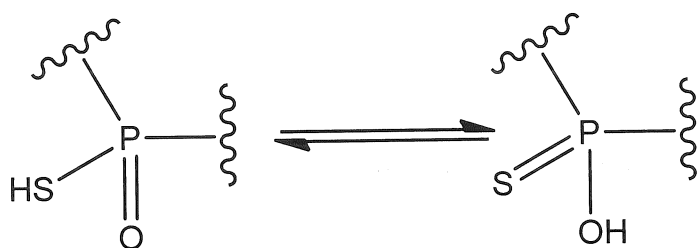
Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của Hợp chất có Công thức I, Công thức II, Công thức III, Công thức IV, hoặc Công thức V, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một số phương án, hợp chất này được sử dụng dưới dạng axit tự do. Theo một số phương án, hợp chất này được sử dụng dưới dạng, ví dụ, muối diamoni (NH_4).

Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư cũng có thể được đề xuất bao gồm hợp chất được đề cập ở đây hoặc muối dược dụng của chúng, cùng với tá dược dược dụng.

Các phương án như được đề cập ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư hoặc bào chế thuốc hữu dụng để điều trị bệnh ung thư. “Bệnh ung thư” có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh ung thư ruột kết, ung thư gan, u hắc tố, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, bệnh bạch cầu tủy cấp tính, và u thần kinh đệm.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng nơi các nhóm thể liên kết với các nguyên tử phospho (P_1, P_2) có cả liên kết đơn và liên kết đôi, chúng có thể nhạy cảm với sự hồ biến hóa. Ví dụ, các hợp chất này có thể hồ biến hóa cân bằng. Một ví dụ được thể hiện dưới đây:



Các chất hồ biến này nên được coi là nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ. Sự thể hiện cấu trúc của một chất hồ biến cho hợp chất cụ thể sẽ là cho cùng hợp chất.

Theo một số phương án, hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất được đề cập ở đây được đề xuất dưới dạng axit tự do hoặc muối dược dụng của chúng. Theo một số phương án, hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất được đề cập ở đây được đề xuất dưới dạng muối NH_4 , mà có thể là muối diamoni.

Như được sử dụng ở đây, “ C_{1-6} alkyl” hoặc “ C_1-C_6 ” alkyl là được nhằm để bao gồm các nhóm hydrocarbon béo no mạch thẳng (thẳng) có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon và các nhóm hydrocarbon béo no mạch nhánh có 3, 4, 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ, C_{1-6} alkyl được dự định để bao gồm nhóm alkyl có 1, 2, 3, 4, 5 và 6 nguyên tử cacbon. Các ví dụ về alkyl bao gồm các gốc có từ một đến sáu nguyên tử cacbon, như, nhưng không bị giới hạn ở, methyl, ethyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, s-butyl, t-butyl, n-pentyl, s-pentyl hoặc n-hexyl. Tương tự, “ C_{1-3} alkyl” hoặc “ C_1-C_3 alkyl” được dự định để bao gồm các nhóm hydrocarbon béo no mạch thẳng (thẳng) có 1, 2, hoặc 3 nguyên tử cacbon và các nhóm hydrocarbon béo no mạch nhánh có 3 nguyên tử cacbon.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “C₃₋₆xycloalkyl” hoặc “C₃-C₆xycloalkyl” dùng để chỉ nhân hydrocacbon không thơm no hoặc chưa no có từ 3 đến 6 nguyên tử cacbon (ví dụ, C₃-C₆). Các ví dụ về xycloalkyl bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xycloheptyl, xyclopentenyl, và xyclohexenyl. Thuật ngữ “C₅₋₆xycloalkyl” hoặc “C₅-C₆xycloalkyl” dùng để chỉ nhân hydrocacbon không thơm no hoặc chưa no có 5 hoặc 6 nguyên tử cacbon (ví dụ, C₅-C₆).

Thuật ngữ “C₅₋₆heteroxycloalkyl” hoặc “C₅-C₆heteroxycloalkyl” dùng để chỉ vòng đơn có 5 đến 6 cạnh không thơm no hoặc chưa no có một hoặc nhiều nguyên tử khác loại (như O, N, hoặc S), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ “C₄₋₆heteroxycloalkyl” hoặc “C₄-C₆heteroxycloalkyl” dùng để chỉ vòng đơn có 4 đến 6 cạnh không thơm no hoặc chưa no có một hoặc nhiều nguyên tử khác loại (như O, N, hoặc S), trừ khi có quy định khác. Các ví dụ về các nhóm heteroxycloalkyl bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, piperidiny, piperaziny, pyrrolidiny, dioxany, tetrahydrofurany, isoindoliny, indoliny, imidazolidiny, pyrazolidiny, oxazolidiny, isoxazolidiny, triazolidiny, oxirany, azetidiny, oxetany, thietany, 1,2,3,6-tetrahydropyridiny, tetrahydropyrany, tetrahydrothiophen, dihydropyrany, pyrany, morpholiny, 1,4-diazepany, 1,4-oxazepany, và loại tương tự.

Các ví dụ bổ sung về các nhóm heteroxycloalkyl bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, acridiny, azociny, benzimidazolyl, benzofurany, benzothiofurany, benzothiophenyl, benzoxazolyl, benzoxazolinyl, benzthiazolyl, benztriazolyl, benztetrazolyl, benzisoxazolyl, benzisothiazolyl, benzimidazolinyl, carbazolyl, 4aH-carbazolyl, carboliny, chromany, chromenyl, xinnoliny, decahydroquinoliny, 2H,6H-1,5,2-dithiaziny, dihydrofuro[2,3-b]tetrahydrofuran, furany, furazany, imidazolidiny, imidazolinyl, imidazolyl, 1H-indazolyl, indolenyl, indoliny, indoliziny, indolyl, 3H-indolyl, isatinoyl, isobenzofurany, isochromany, isoindazolyl, isoindoliny, isoindolyl, isoquinoliny, isothiazolyl, isoxazolyl, metylendioxyphenyl, morpholiny, naphthyridiny, octahydroisoquinoliny, oxadiazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,2,5-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazol5(4H)-on, oxazolidiny, oxazolyl, oxindolyl, pyrimidiny, phenanthridiny, phenanthroliny, phenaziny, phenothiaziny, phenoxathiny, phenoxaziny, phthalaziny, piperaziny, piperidiny, piperidonyl, 4-piperidonyl, piperonyl, pteridiny, puriny, pyrany, pyraziny, pyrazolidiny, pyrazoliny, pyrazolyl, pyridaziny, pyrido-oxazol,

pyridoimidazol, pyridothiazol, pyridinyl, pyridyl, pyrimidinyl, pyrrolidinyl, pyrrolinyl, 2H-pyrolyl, pyrolyl, quinazolinyl, quinolinyl, 4H-quinolizinyl, quinoxalinyl, quinuclidinyl, tetrahydrofuranyl, tetrahydroisoquinolinyl, tetrahydroquinolinyl, tetrazolyl, 6H-1,2,5-thiadiazinyl, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,2,5-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, thianthrenyl, thiazolyl, thienyl, thienothiazolyl, thienooxazolyl, thienoimidazolyl, thiophenyl, triazinyl, 1,2,3-triazolyl, 1,2,4-triazolyl, 1,2,5-triazolyl, 1,3,4-triazolyl và xanthenyl.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “C₅₋₆aryl” hoặc “C₅-C₆aryl” dùng để chỉ nhân hydrocacbon thơm có 5 đến 6 nguyên tử cacbon (ví dụ, C₅-C₆) mà không chứa nguyên tử khác loại bất kỳ trong cấu trúc nhân này.

Thuật ngữ “C₃₋₆heteroaryl” hoặc “C₃-C₆heteroaryl” dùng để chỉ vòng đơn thơm có từ 3 đến 6 cạnh có một hoặc nhiều nguyên tử khác loại (như O, N, hoặc S), trừ khi có quy định khác, ngoại trừ nhân heteroaryl sẽ bao gồm không nhiều hơn một nguyên tử oxy hoặc một nguyên tử lưu huỳnh.

Thuật ngữ “C₂₋₆alkenyl” bao gồm các nhóm béo chưa no có 2, 3, 4, 5, hoặc 6 nguyên tử cacbon và chứa ít nhất một liên kết đôi. Ví dụ, thuật ngữ “C₂₋₆alkenyl” bao gồm các nhóm alkenyl mạch thẳng (ví dụ, etenyl, propenyl, butenyl, pentenyl, hexenyl), và các nhóm alkenyl mạch nhánh. Theo các phương án cụ thể, nhóm alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh này có sáu nguyên tử cacbon hoặc ít hơn trong khung của nó (ví dụ, C₂-C₆ đối với mạch thẳng, C₃-C₆ đối với mạch nhánh). Thuật ngữ “C₂₋₆alkenyl” bao gồm các nhóm alkenyl chứa từ hai đến sáu nguyên tử cacbon.

Thuật ngữ “C₂₋₆alkynyl” bao gồm các nhóm béo chưa no có 2, 3, 4, 5, hoặc 6 nguyên tử cacbon, nhưng chứa ít nhất một liên kết ba. Ví dụ, “alkynyl” bao gồm các nhóm alkynyl mạch thẳng (ví dụ, etynyl, propynyl, butynyl, pentynyl, hexynyl), và các nhóm alkynyl mạch nhánh. Theo các phương án cụ thể, nhóm alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh này có sáu nguyên tử cacbon hoặc ít hơn trong khung của nó (ví dụ, C₂-C₆ đối với mạch thẳng, C₃-C₆ đối với mạch nhánh). Thuật ngữ “C₂₋₆alkynyl” bao gồm các nhóm alkynyl chứa từ hai đến sáu nguyên tử cacbon.

Phương pháp điều trị

Theo các phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng lượng hữu hiệu có tác dụng

điều trị của hợp chất được đề cập ở đây, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một số phương án, hợp chất được sử dụng này được đề xuất dưới dạng axit tự do hoặc muối được dụng của chúng. Theo một số phương án, hợp chất được sử dụng này được đề xuất dưới dạng muối NH_4 , axit tự do hoặc muối được dụng của chúng. Theo một số phương án, hợp chất được đề xuất dưới dạng muối NH_4 .

Thuật ngữ “được thể tùy ý” dùng để chỉ gốc có các nhóm thể được chỉ định thay thế một hoặc nhiều nguyên tử hydro trên một hoặc nhiều nguyên tử mang hydro trong gốc này.

Các hóa chất như được đặt tên hoặc được mô tả được nhằm để bao gồm tất cả các chất đồng vị xuất hiện tự nhiên của các nguyên tử xuất hiện trong các hợp chất theo sáng chế. Các chất đồng vị bao gồm các nguyên tử mà có cùng một số nguyên tử nhưng số khối khác nhau. Theo ví dụ tổng quát và không giới hạn, các chất đồng vị của hydro ^1H bao gồm triti và đơteri, và các chất đồng vị của cacbon ^{12}C bao gồm ^{13}C và ^{14}C .

Liều dùng

Liều dùng tối ưu để điều trị bệnh ung thư có thể được xác định theo kinh nghiệm cho từng cá thể bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết và sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt tính của các chất; độ tuổi, khối lượng cơ thể, thể trạng, giới tính và chế độ ăn uống của đối tượng; thời gian và đường dùng; và các thuốc khác mà đối tượng đang sử dụng. Liều dùng tối ưu có thể được thiết lập bằng cách sử dụng thử nghiệm thông thường và các quy trình đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Việc dùng các hợp chất nêu trên có thể là theo con đường thích hợp.

"Muối được dụng" như được sử dụng ở đây để chỉ các muối cộng axit hoặc các muối cộng bazơ của các hợp chất theo sáng chế. Muối được dụng là muối bất kỳ mà giữ hoạt tính của hợp chất gốc và không truyền bất kỳ hiệu quả có hại quá mức hoặc không mong muốn nào lên đối tượng sử dụng nó và trong ngữ cảnh trong đó nó được sử dụng. Các muối được dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kim loại phức chất và muối của cả axit vô cơ và axit carboxylic. Các muối được dụng cũng bao gồm các muối kim loại như muối nhôm, canxi, sắt, magie, mangan và phức hợp. Ngoài ra, muối được dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, muối axit như axetic, aspartic, alkylsulfonic, arylsulfonic, axetil, benzensulfonic, benzoic, bicarbonic, bisulfuric, bitartaric, butyric, canxi edetat, camsyllic, cacbonic, clorobenzoic, xitric, edetic, edisyllic, estolic, esyl,

esylic, formic, fumaric, gluceptic, gluconic, glutamic, glycolic, glycolylarsanilic, hexamic, hexylresorxinoic, hydrabamic, hydrobromic, hydrochloric, hydroclorua, hydroiodic, hydroxynaphthoic, isethionic, lactic, lactobionic, maleic, malic, malonic, mandelic, metansulfonic, metylnitric, metylsulfuric, muxic, muconic, napsylic, nitric, oxalic, p-nitrometansulfonic, pamoic, pantothenic, phosphoric, monohydro phosphoric, dihydro phosphoric, phthalic, polygalactouronic, propionic, salixylic, stearic, succinic, sulfamic, sulfanlic, sulfonic, sulfuric, tannic, tartaric, teoclic, toluensulfonic, và các muối tương tự. Muối natri và muối kali cũng có thể được điều chế.

Các phương án có thể là các muối diamoni. Các muối được dụng có thể thu được từ các axit amin bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, xystein. Các phương pháp điều chế hợp chất dưới dạng muối là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Stahl *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH; Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, 2002; Berge *et al.*, J. Pharm. Sci. 66: 1, 1977).

"Lượng hữu hiệu" của chất trị liệu là lượng đủ để tạo ra lợi ích trị liệu quan sát được so với bệnh ung thư không được điều trị ở đối tượng hoặc bệnh nhân.

Các hoạt chất như được đề cập ở đây có thể được kết hợp với chất mang được dụng để tạo ra dược phẩm của chúng. Việc lựa chọn cụ thể đối với chất mang và dạng bào chế sẽ phụ thuộc vào đường dùng cụ thể mà dược phẩm được dự định dùng.

"Chất mang được dụng" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất mang, chất hỗ trợ, hoặc tá dược lỏng không độc mà không phá vỡ hoạt tính dược lý của hợp chất mà nó được bào chế cùng. Chất mang, chất hỗ trợ hoặc tá dược lỏng được dụng mà có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, axit sorbic, kali sorbat, các hỗn hợp glyxerit từng phần của các axit béo thực vật no, nước, muối hoặc chất điện phân, dinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, các muối kẽm, silic dioxit keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrrolidon, các chất nền xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, polyetylen glycol và mỡ cừu.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong miệng, xịt hít, khu trú, trực tràng, mũi, má, âm đạo hoặc vật chứa được cấy, v.v. Theo một số phương án, chế phẩm này bao gồm các thành phần có nguồn gốc tự nhiên

hoặc không tự nhiên. Theo một số phương án, chế phẩm hoặc chất mang này có thể được đề xuất dưới dạng vô trùng. Các ví dụ không giới hạn về các chất mang vô trùng này bao gồm nước không chứa ngoại độc tố hoặc nước không chứa pyrogen.

Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” như được sử dụng ở đây bao gồm các kỹ thuật truyền hoặc tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong khớp, trong hoạt dịch, trong xương ức, nội tủy mạc, trong gan, trong thương tổn và trong sọ. Theo các phương án cụ thể, các hợp chất được sử dụng trong tĩnh mạch, đường miệng, dưới da, hoặc trong cơ. Các dạng tiêm vô trùng của dược phẩm theo sáng chế có thể là huyền phù chứa nước hoặc chứa dầu. Các huyền phù này có thể được bào chế theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực bằng cách sử dụng các chất phân tán hoặc chất tạo ẩm và chất tạo huyền phù thích hợp. Các dược phẩm tiêm vô trùng này cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù tiêm vô trùng trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc được chấp nhận ngoài đường ruột. Trong số các tá dược lỏng và dung môi được chấp nhận mà có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorit đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng được sử dụng theo cách thông thường làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù.

Với mục đích này, dầu không bay hơi thơm dịu bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm các mono- hoặc di-glyxerit tổng hợp. Các axit béo và các dẫn xuất glyxerit của chúng là hữu dụng trong bào chế dạng tiêm, như các dầu được dùng tự nhiên, như dầu ôliu hoặc dầu thầu dầu, đặc biệt là trong các phiên bản được polyoxyetyl hóa của chúng. Các dung dịch hoặc huyền phù dầu này cũng có thể chứa chất pha loãng hoặc chất phân tán rượu mạch dài, như carboxymetyl xenluloza hoặc các chất phân tán tương tự thường được sử dụng trong bào chế các dạng liều được dùng bao gồm nhũ tương và huyền phù. Các chất hoạt động bề mặt thường được sử dụng khác, như Tweens, Spans và các chất nhũ hóa khác mà thường được sử dụng khác trong việc sản xuất chất rắn, chất lỏng được dùng, hoặc các dạng liều được dùng khác cũng có thể được sử dụng cho mục đích bào chế.

Để dùng qua đường miệng, hợp chất hoặc muối có thể được đề xuất dưới dạng liều dùng qua đường miệng chấp nhận được, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, viên nang, viên nén, huyền phù hoặc dung dịch chứa nước. Trong trường hợp viên nén dùng qua đường miệng, các chất mang thường được sử dụng bao gồm lactoza và tinh bột ngô. Các chất bôi trơn, như magie stearat, cũng có thể được bổ sung. Để dùng qua đường

miệng dưới dạng viên nang, các chất pha loãng hữu dụng bao gồm lactoza và tinh bột ngô khô. Khi các huyền phù chứa nước được yêu cầu để dùng qua đường miệng, hoạt chất này có thể được kết hợp với các chất nhũ hóa và chất tạo huyền phù. Nếu muốn, các chất tạo ngọt, chất tạo hương vị hoặc chất tạo màu cụ thể cũng có thể được bổ sung. Ngoài ra, các chất bảo quản cũng có thể được bổ sung. Các ví dụ thích hợp về các chất bảo quản được dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau như các dung môi, ví dụ etanol, propylen glycol, rượu benzylic, clorobutanol, các muối amoni bậc bốn, và paraben (như metyl paraben, etyl paraben, propyl paraben, v.v.).

"Giải phóng ngay" có nghĩa là bao gồm sự giải phóng thông thường, trong đó sự giải phóng được chất bắt đầu ngay sau khi sử dụng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "giải phóng ngay" bao gồm các dạng liều dùng cho phép được chất hòa tan trong khoang dạ dày, mà không có xu hướng trì hoãn hoặc kéo dài quá trình hòa tan hoặc hấp thụ của thuốc. Mục đích là để thuốc được giải phóng nhanh sau khi dùng, ví dụ, để nó có thể giải phóng ít nhất 80% được chất trong khoảng 30 phút sau khi bắt đầu hòa tan trong thử nghiệm hòa tan.

"Giải phóng liên tục" hoặc "giải phóng kéo dài" bao gồm các dạng liều dùng mà các đặc tính giải phóng được chất của nó theo thời gian và/hoặc vị trí được chọn để hoàn thành các mục đích điều trị hoặc thuận tiện không được đưa ra bằng các dạng liều dùng thông thường như dung dịch hoặc dạng liều dùng giải phóng ngay.

Thuật ngữ "trạng thái ổn định" nghĩa là mức huyết tương cho hoạt chất đưa ra đã đạt được và được duy trì với các liều tiếp theo của hoạt chất tại mức mà tại hoặc trên mức hữu hiệu có tác dụng điều trị tối thiểu và dưới mức huyết tương độc tính tối thiểu cho hoạt chất đưa ra.

Thuật ngữ "ché phẩm đơn" như được sử dụng ở đây để chỉ chất mang hoặc tá dược đơn được bào chế để phân phối các lượng hiệu quả của cả hai chất trị liệu cho bệnh nhân. Tá dược đơn này được thiết kế để phân phối lượng hiệu quả của từng chất cùng với chất mang hoặc tá dược được dụng bất kỳ. Theo một số phương án, tá dược là viên nén, viên nang, viên tròn, hoặc miếng dán.

Thuật ngữ "liều đơn vị" được sử dụng ở đây có nghĩa là sử dụng đồng thời cả hai chất cùng nhau, trong một dạng liều dùng, cho bệnh nhân đang được điều trị. Theo một

số phương án, liều đơn vị này là chế phẩm đơn. Theo các phương án cụ thể, liều đơn vị này bao gồm một hoặc nhiều tá dược sao cho mỗi tá dược bao gồm lượng hiệu quả của chất cùng với các chất mang và tá dược được dụng. Theo một số phương án, liều đơn vị này là một hoặc nhiều viên nén, viên nang, viên tròn, hoặc miếng dán được sử dụng cho bệnh nhân tại cùng thời điểm.

Thuật ngữ "khoảng liều" như được sử dụng ở đây để chỉ giới hạn trên hoặc dưới của mức thay đổi có thể chấp nhận được của lượng chất đã định. Thông thường, liều của một chất với lượng bất kỳ nằm trong khoảng đã định có thể được sử dụng cho bệnh nhân đang trải qua điều trị.

Thuật ngữ "điều trị" được sử dụng ở đây có nghĩa là làm giảm nhẹ, giảm hoặc làm dịu ít nhất một triệu chứng của bệnh ở đối tượng. Ví dụ, liên quan đến bệnh ung thư, thuật ngữ "điều trị" có thể có nghĩa là ngăn chặn, trì hoãn sự khởi phát (tức là, giai đoạn trước khi biểu hiện lâm sàng của bệnh hoặc triệu chứng của bệnh) và/hoặc giảm nguy cơ phát triển hoặc làm xấu đi triệu chứng của bệnh. Thuật ngữ "bảo vệ" được sử dụng ở đây có nghĩa là ngăn chặn, trì hoãn hoặc điều trị, hoặc tất cả, nếu thích hợp, sự phát triển hoặc sự tiếp tục hoặc làm trầm trọng thêm các triệu chứng của bệnh ở đối tượng.

Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "bệnh nhân" được dự định để bao gồm động vật có khả năng bị mắc hoặc bị bệnh ung thư. Các ví dụ về đối tượng hoặc bệnh nhân bao gồm động vật có vú, ví dụ, người, chó, bò, ngựa, lợn, cừu, dê, mèo, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, và động vật chuyển gen không phải người. Theo các phương án cụ thể, đối tượng này là người, ví dụ, người bị mắc, có nguy cơ bị mắc, hoặc có khả năng tiềm tàng bị mắc bệnh ung thư.

Thuật ngữ "khoảng" hoặc "xấp xỉ" thường có nghĩa là nằm trong khoảng 20%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng 10% và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng 5% giá trị hoặc khoảng đã cho. Ngoài ra, đặc biệt là trong các hệ thống sinh học, thuật ngữ "khoảng" có nghĩa là khoảng nằm trong log (tức là, thứ bậc của độ lớn), tốt hơn là nằm trong hệ số là hai của giá trị đã cho.

Cách sử dụng các thuật ngữ "một" và các dạng đề cập tương tự trong ngữ cảnh mô tả sáng chế (đặc biệt là trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây) cần được hiểu là bao quát cả dạng số ít và dạng số nhiều, trừ khi trong bản mô tả này có quy

định khác hoặc rõ ràng trái ngược theo văn cảnh. Các thuật ngữ “bao gồm”, “có”, “bao gồm cả” và “chứa” cần được hiểu là các thuật ngữ có kết thúc mở (tức là, có nghĩa là “bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở,”) trừ khi có quy định khác. Việc liệt kê các khoảng trị số trong bản mô tả thuần túy chỉ để làm phương pháp tốc ký đề cập một cách riêng biệt đến mỗi trị số tách biệt nằm trong khoảng này, trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, và mỗi trị số tách biệt được đưa vào bản mô tả như thể nó được liệt kê một cách riêng biệt trong bản mô tả.

Các rối loạn tăng sinh tế bào làm ví dụ mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng một hoặc nhiều hợp chất được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh ung thư, tiền ung thư hoặc tình trạng tiền ung thư, và các thương tổn di căn trong mô và các cơ quan trong cơ thể. Các rối loạn tăng sinh tế bào có thể bao gồm chứng tăng sản, dị sản, và loạn sản.

Hợp chất được bộc lộ ở đây, hoặc muối được dụng của chúng, có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tăng sinh tế bào, hoặc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư, ở đối tượng có nguy cơ tăng phát triển bệnh ung thư so với quần thể nói chung, hoặc được sử dụng để xác định các ứng viên thích hợp cho mục đích này.

Dược phẩm và đường dùng

Sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối được dụng của chúng để điều trị bệnh ung thư. Các dược phẩm này có thể còn bao gồm chất mang hoặc tá dược, chất ổn định, chất tạo hương vị, và/hoặc chất tạo màu.

Hợp chất hoặc muối được dụng của chúng có thể được sử dụng bằng cách dùng nhiều đường dùng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các đường dùng bao gồm dùng qua đường miệng. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm chứa hợp chất hoặc muối được dụng của chúng có thể được dùng qua đường miệng dưới dạng chất lỏng, sirô, viên nén, viên nang, dạng bột, dạng rắn, dạng nhai, hoặc đĩa có thể hòa tan. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong tĩnh mạch hoặc qua da. Các đường dùng bổ sung là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R., Ed., 20th Edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

Theo một số phương án, hợp chất hoặc muối được dụng này được bào chế dưới dạng bột nhão, thạch, hoặc huyền phù. Ví dụ, dược chất này được hòa tan, được kẹp

hoặc được tạo huyền phù dưới dạng hạt thuốc, hạt được bao vi nang, hoặc hạt thuốc-polyme trong dung dịch gelatin hoặc bán rắn. Lợi ích của chế phẩm dạng thạch dùng qua đường miệng là dễ sử dụng thuốc hơn cho bệnh nhân khó nuốt viên nén, viên nang hoặc viên tròn. Theo các phương án cụ thể, hợp chất này được trộn kỹ và được tạo huyền phù trong môi trường thích hợp để tạo thành bột nhão hoặc dạng gel. Các chất bổ sung có thể tùy ý được trộn để tạo hương vị trong quá trình dùng qua đường miệng. Bor-lac hoặc alginat, được tạo hương vị với quả mâm xôi và chất tạo ngọt là ví dụ về nhiều chất dầu vị thích hợp. Theo các phương án khác nhau, bột nhão hoặc thạch này cũng có thể được bào chế với các chất kết dính hoặc tá dược thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để sử dụng tại chỗ.

Phương pháp bào chế chế phẩm giải phóng kéo dài dưới dạng viên nén, viên nang hoặc viên tròn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án, chế phẩm giải phóng kéo dài này được bào chế bằng cách phủ hoạt chất của thuốc bằng polyme, tốt hơn là polyme không hòa tan trong nước. Ví dụ, polyme không hòa tan trong nước được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm là chất phủ giải phóng kéo dài, chất phủ trong ruột, hoặc chất phủ trong dạ dày. Polyme không hòa tan trong nước này có thể bao gồm, ví dụ, etyl xenluloza, nhựa cánh kiến tinh khiết, nhựa cánh kiến trắng, copolyme RS aminoalkyl metacrylat, hydroxypropyl metylxenluloza phtalat, hydroxypropyl metylxenluloza axetat succinat, carboxymetyletyl-xenluloza, xenluloza axetat phtalat, copolyme axit metacrylic L, copolyme LD axit metacrylic, copolyme S axit metacrylic, copolyme E aminoalkyl metacrylat, hoặc polyvinyl axetal diethylaminoaxetat.

Loại, mức độ thể và khối lượng phân tử của các polyme không hòa tan trong nước có thể phụ thuộc vào độ hòa tan của hoạt chất trong nước hoặc rượu, mức giải phóng kéo dài mong muốn và các yếu tố tương tự. Các polyme không hòa tan trong nước có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp. Có thể được kết hợp thêm dầu được hydro hóa, axit stearic, hoặc xetanol dưới dạng chất trợ phủ, và triglyxerit mạch trung bình, triaxetin, trietyl xitrat, hoặc xetanol dưới dạng chất dẻo hóa.

Theo một số phương án, chế phẩm giải phóng kéo dài này là viên nén loại chất nền và dạng hạt. Hoạt chất này có thể được phủ với lên đến 3 loại polyme khác nhau. Ba loại polyme khác nhau này có thể bao gồm: 1) polyme không hòa tan trong nước, như etylxenluloza; 2) polyme tạo gel không phụ thuộc vào độ pH, như hydroxypropyl metylxenluloza; và 3) polyme tạo gel phụ thuộc vào độ pH, như natri alginat. Ba loại

polyme khác nhau này có thể được sử dụng cùng nhau để làm yếu đi tốc độ giải phóng thuốc.

Dạng liều lượng: Các tính chất giải phóng

Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể đạt được mức độ hiệu quả kéo dài. Tuy nhiên, sự phơi nhiễm và/hoặc độ sinh khả dụng của hoạt chất có thể thay đổi dựa vào nhiều yếu tố như, ví dụ, ngưỡng hấp thụ, chất mang hoặc tá dược được sử dụng trong chế phẩm, kiểu phân phối chế phẩm, và/hoặc thời gian chuyển tiếp của hoạt chất qua đường dạ dày-ruột của bệnh nhân.

Liệu pháp có thể bao gồm ít nhất một phần giải phóng kéo dài để thực hiện chức năng giải phóng kéo dài và một phần giải phóng ngay để thực hiện chức năng giải phóng ngay. Theo các phương án cụ thể, khi liệu pháp này là dưới dạng liều lượng đơn, nó có thể dưới dạng viên nén từ hỗn hợp của các hạt nhỏ giải phóng kéo dài cấu thành phần giải phóng kéo dài và các hạt nhỏ giải phóng ngay cấu thành phần giải phóng ngay, chế phẩm viên nang thu được bằng cách nạp đầy viên nang bằng hạt giải phóng kéo dài và hạt giải phóng ngay, hoặc các viên nén được phủ ép trong đó lớp ngoài cấu thành phần giải phóng ngay được tạo ra trên lõi cấu thành phần giải phóng kéo dài. Tuy nhiên, không có giới hạn đối với các phương án trên đây.

Hơn nữa, không có các giới hạn cụ thể về trạng thái chứa thuốc trong chế phẩm hoặc trong phần giải phóng ngay hoặc phần giải phóng kéo dài; hợp chất này có thể được phân tán đồng nhất trong chế phẩm, phần giải phóng ngay hoặc phần giải phóng kéo dài, hoặc có thể được chứa chỉ trong một phần của chế phẩm, phần giải phóng ngay hoặc phần giải phóng kéo dài, hoặc có thể được chứa sao cho có gradien nồng độ.

Phần giải phóng kéo dài trong chế phẩm theo sáng chế có thể chứa ít nhất một chất polyme không phụ thuộc vào độ pH hoặc chất polyme phụ thuộc vào độ pH để kiểm soát quá trình giải phóng thuốc.

Chất polyme không phụ thuộc vào độ pH được sử dụng ở đây có thể bao gồm chất polyme có trạng thái tích điện hầu như không thay đổi trong các điều kiện độ pH thường được tìm thấy trong đường dạ dày-ruột, đặc biệt là độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 8. Điều này có nghĩa là, ví dụ, chất polyme mà không có nhóm chức có trạng thái tích điện của nó thay đổi phụ thuộc vào độ pH như các nhóm chức bazơ như nhóm amino hoặc các nhóm chức axit như nhóm axit carboxylic. Lưu ý rằng chất polyme không phụ

thuộc vào độ pH này có thể được bao gồm nhằm làm cho chế phẩm theo sáng chế có chức năng giải phóng kéo dài, nhưng cũng có thể được bao gồm nhằm mục đích khác. Hơn nữa, chất polyme không phụ thuộc vào độ pH được sử dụng trong sáng chế có thể không hòa tan trong nước, hoặc có thể nở trong nước hoặc hòa tan trong nước để tạo thành dạng gel.

Ví dụ về chất polyme không phụ thuộc vào độ pH không hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ete xenluloza, este xenluloza, và copolyme của axit metacrylic-axit acrylic (tên thương mại là Eudragit, được sản xuất bởi Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Đức). Các ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ete xenluloza alkyl như etylxenluloza (tên thương mại là Ethocel, được sản xuất bởi Dow Chemical Company, Mỹ), etyl metylxenluloza, etyl propylxenluloza hoặc isopropylxenluloza, và butylxenluloza, ete xenluloza aralkyl như benzyl xenluloza, ete xenluloza xyanoalkyl như xyanoethylxenluloza, các este của axit hữu cơ xenluloza như xenluloza axetat butyrat, xenluloza axetat, xenluloza propionat hoặc xenluloza butyrat, và xenluloza axetat propionat, copolyme etyl acrylat-metyl metacrylat (tên thương mại là Eudragit NE, được sản xuất bởi Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Đức), và copolyme RS aminoalkyl metacrylat (tên thương mại là Eudragit RL, Eudragit RS). Không có giới hạn cụ thể về đường kính hạt trung bình của polyme không hòa tan trong nước được sử dụng trong sáng chế, nhưng thường thì đường kính hạt trung bình càng thấp thì đặc tính càng tốt, tốt hơn là với đường kính hạt trung bình nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 μm , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 50 μm , đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 15 μm , tốt nhất là nằm trong khoảng từ 5 đến 15 μm . Hơn nữa, các ví dụ về chất polyme không phụ thuộc vào độ pH hòa tan trong nước hoặc nở trong nước bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polyetylen oxit (tên thương mại là Polyox, được sản xuất bởi Dow Chemical Company, khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 100.000 đến 7.000.000), hydroxypropyl xenluloza được thế thấp (tên thương mại là L-HPC, được sản xuất bởi Shin-Etsu Chemical, Nhật Bản), hydroxypropyl xenluloza (tên thương mại là HPC, được sản xuất bởi Nippon Soda, Co., Ltd, Nhật Bản), hydroxypropyl metylxenluloza (tên thương mại là Metolose 60SH, 65SH, 90SH, được sản xuất bởi Shin-Etsu Chemical, Nhật Bản), và metylxenluloza (tên thương mại là Metolose SM, được sản xuất bởi Shin-Etsu Chemical, Nhật Bản).

Theo một số phương án, một chất polyme không phụ thuộc vào độ pH có thể

được chứa trong chế phẩm, hoặc nhiều chất polyme không phụ thuộc vào độ pH có thể được chứa trong chế phẩm. Chất polyme không phụ thuộc vào độ pH này, nếu được sử dụng trong các phương án được đề cập ở đây, có thể là chất polyme không hòa tan trong nước, tốt hơn nữa là etylxenluloza, copolyme etyl acrylat-metyl metacrylat (tên thương mại là Eudragit NE), hoặc copolyme RS aminoalkyl metacrylat (tên thương mại là Eudragit RL, Eudragit RS). Đặc biệt tốt hơn nếu là ít nhất một trong số etylxenluloza và copolyme RS aminoalkyl metacrylat. Tốt nhất, nếu là etylxenluloza. Không có giới hạn cụ thể về lượng chất polyme không phụ thuộc vào độ pH được chứa trong chế phẩm; lượng này có thể được điều chỉnh theo mục đích như kiểm soát quá trình giải phóng thuốc kéo dài.

Chất polyme phụ thuộc vào độ pH mà có thể được sử dụng theo các phương án được đề cập ở đây có thể là chất polyme có trạng thái tích điện của nó trong các điều kiện độ pH thường được tìm thấy trong đường dạ dày-ruột, đặc biệt là độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 8. Điều này có nghĩa là, ví dụ, chất polyme có nhóm chức mà trạng thái tích điện của nó thay đổi phụ thuộc vào độ pH như các nhóm chức bazơ như nhóm amino hoặc các nhóm chức axit như nhóm axit carboxylic. Tốt hơn, nếu các nhóm chức phụ thuộc vào độ pH của chất polyme phụ thuộc vào độ pH này là nhóm chức axit, tốt nhất là với chất polyme phụ thuộc vào độ pH có các nhóm axit carboxylic.

Chất polyme phụ thuộc vào độ pH được sử dụng trong sáng chế có thể không hòa tan trong nước, hoặc có thể nở trong nước hoặc hòa tan trong nước để tạo thành dạng gel. Các ví dụ về các chất polyme phụ thuộc vào độ pH được sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất polyme ruột. Các ví dụ về chất polyme ruột bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, copolyme của axit metacrylic-metyl metacrylat (Eudragit L100, Eudragit S100, được sản xuất bởi Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Đức), copolyme của axit metacrylic-etyl acrylat (Eudragit L100-55, Eudragit L30D-55, được sản xuất bởi Rohm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Đức), hydroxypropyl metylxenluloza phtalat (HP-55, HP-50, được sản xuất bởi Shin-Etsu Chemical, Nhật Bản), hydroxypropyl metylxenluloza axetat succinat (AQOAT, được sản xuất bởi Shin-Etsu Chemical, Nhật Bản), carboxymetyl etylxenluloza (CMEC, được sản xuất bởi Freund Corporation, Nhật Bản), và xenluloza axetat phtalat.

Các ví dụ về chất polyme phụ thuộc vào độ pH mà nở trong nước hoặc hòa tan trong nước để tạo thành dạng gel bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, axit alginic,

pectin, polyme carboxyvinyl, và carboxymetyl xenluloza. Theo sáng chế, một chất polyme phụ thuộc vào độ pH có thể được chứa trong chế phẩm, hoặc nhiều chất polyme phụ thuộc vào độ pH có thể được chứa trong chế phẩm. Tốt hơn, nếu chất polyme phụ thuộc vào độ pH được sử dụng trong sáng chế là chất polyme ruột, tốt hơn nữa nếu là copolyme của axit metacrylic-etyl acrylat, copolyme của axit metacrylic-metyl metacrylat, hydroxypropyl methylxenluloza phtalat, hoặc hydroxypropyl methylxenluloza axetat succinat, đặc biệt tốt hơn nếu là copolyme của axit metacrylic-etyl acrylat.

Khi sử dụng chất polyme phụ thuộc vào độ pH trong quá trình sản xuất chế phẩm theo sáng chế, sản phẩm có bán sẵn của loại bột hoặc loạt hạt nhỏ, hoặc loại huyền phù trong đó chất polyme phụ thuộc vào độ pH này đã được phân tán trước trong dung môi có thể được sử dụng dưới dạng như vậy, hoặc sản phẩm có bán sẵn này có thể được sử dụng được phân tán trong nước hoặc dung môi hữu cơ. Đường kính hạt của chất polyme phụ thuộc vào độ pH càng nhỏ thì đặc tính càng tốt, tốt hơn là với chất polyme phụ thuộc vào độ pH là loại bột. Trong trường hợp copolyme của axit metacrylic-etyl acrylat, ví dụ, là Eudragit L100-55. Không có giới hạn cụ thể về đường kính hạt trung bình của chất polyme phụ thuộc vào độ pH được sử dụng trong sáng chế, nhưng tốt hơn là đường kính hạt trung bình nằm trong khoảng từ 0,05 đến 100 μm , tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 70 μm , tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 50 μm . Hơn nữa, không có giới hạn cụ thể về đường kính hạt trung bình của chất polyme phụ thuộc vào độ pH, ví dụ, trong trường hợp chất polyme ruột, lượng này thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 90 phần khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 70 phần khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 60 phần khối lượng, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 50 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng của chế phẩm.

Liệu pháp theo các phương án được đề cập ở đây có thể còn chứa các chất bổ trợ khác nhau bất kỳ, như chất bổ trợ bất kỳ trong số các chất mang dược dụng khác nhau như chất pha loãng, chất bôi trơn, chất kết dính và chất gây rã, cũng như chất bảo quản, chất tạo màu, chất tạo ngọt, chất dẻo hóa, chất phủ màng và v.v., nếu cần. Ví dụ về các chất pha loãng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, lactoza, mannitol, diaxit canxi phosphat, tinh bột, tinh bột đã được gelatin hóa sơ bộ, xenluloza tinh thể, anhydrit silic nhẹ, nhôm silicat tổng hợp, magie aluminat metasilicat hoặc chất tương tự. Ví dụ về chất bôi trơn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, magie stearat, canxi stearat, đá tal, natri

stearyl fumarat hoặc loại tương tự. Ví dụ về chất kết dính bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hydroxypropyl xenluloza, metylxenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, polyvinylpyrrolidon hoặc các chất tương tự. Ví dụ về chất gây rã bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, carboxymetyl xenluloza, canxi carboxymetyl xenluloza, croscarmelloza natri, tinh bột natri carboxymetyl, hydroxypropyl xenluloza được thể thấp hoặc các chất tương tự. Các ví dụ về chất bảo quản bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, este axit paraoxybenzoic, rượu clorobutanol, rượu benzylic, rượu phenetylic, axit dehydroaxetic, axit sorbic hoặc các chất tương tự. Ví dụ được ưu tiên về chất tạo màu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất nhuộm không hòa tan trong nước, chất nhuộm màu tự nhiên (ví dụ, .beta.-caroten, clorophyll, oxit sắt đỏ), oxit sắt vàng, oxit sắt đỏ, oxit sắt đen hoặc các chất tương tự. Ví dụ được ưu tiên về chất tạo ngọt bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, natri saccharin, dikali glyxyrrhizat, aspartam, đường cỏ ngọt stevia hoặc các chất tương tự. Ví dụ về chất dẻo hóa bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, este của axit béo glycerol, trietyl xitrat, propylen glycol, polyetylen glycol hoặc các chất tương tự. Ví dụ về chất phủ màng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hydroxypropyl metylxenluloza, hydroxypropyl xenluloza hoặc các chất tương tự.

Phương pháp sản xuất

Đối với các phương án sản xuất như được đề cập ở đây, một phương pháp thông thường, hoặc sự kết hợp của các phương pháp thông thường, có thể được sử dụng. Ví dụ, khi sản xuất các hạt chứa thuốc là phân giải phóng kéo dài hoặc phân giải phóng ngay, sự tạo hạt là hoạt động chính, nhưng hoạt động này có thể được kết hợp với các hoạt động khác như trộn, sấy, rây, và phân loại. Phương pháp tạo hạt là, ví dụ, phương pháp tạo hạt ẩm trong đó chất kết dính và dung môi được bổ sung vào bột và quá trình tạo hạt được thực hiện, phương pháp tạo hạt khô trong đó bột này được ép và quá trình tạo hạt được thực hiện, phương pháp tạo hạt nấu chảy trong đó chất kết dính mà tan chảy khi gia nhiệt được bổ sung và gia nhiệt và quá trình tạo hạt được thực hiện, hoặc các phương pháp tương tự có thể được sử dụng.

Ngoài ra, theo phương pháp tạo hạt này, phương pháp hoạt động như phương pháp tạo hạt trộn sử dụng máy trộn kiểu hành tinh, máy trộn trục vít hoặc các loại máy tương tự, phương pháp tạo hạt phối trộn tốc độ cao sử dụng máy trộn Henschel, máy trộn Super hoặc các loại máy tương tự, phương pháp tạo hạt ép đùn sử dụng máy tạo hạt

hình trụ, máy tạo hạt quay, máy tạo hạt ép đùn trực vít, máy tạo hạt loại nghiền viên tròn hoặc các loại máy tương tự, phương pháp tạo hạt ẩm có lực cắt cao, phương pháp tạo hạt tầng sôi, phương pháp tạo hạt nén, phương pháp tạo hạt nghiền vụn, hoặc phương pháp tạo hạt phun có thể được sử dụng. Sau khi tạo hạt, bước sấy sử dụng máy sấy, tầng sôi hoặc các loại tương tự, phá vỡ, và sàng có thể được thực hiện để thu các hạt nhỏ hoặc hạt mịn để sử dụng. Hơn nữa, dung môi tạo hạt có thể được sử dụng khi điều chế chế phẩm theo sáng chế. Không có giới hạn cụ thể về dung môi tạo hạt này, nó có thể là nước hoặc loại bất kỳ trong số các dung môi hữu cơ khác nhau, ví dụ, nước, rượu bậc thấp hơn như metanol hoặc etanol, keton như axeton hoặc metyl etyl keton, metylen clorua, hoặc hỗn hợp của chúng.

Đối với hạt giải phóng kéo dài được chứa trong chế phẩm theo các phương án, ít nhất một dược chất và ít nhất một chất được chọn từ chất polyme không phụ thuộc vào độ pH và chất polyme phụ thuộc vào độ pH được trộn cùng nhau, chất pha loãng và chất kết dính được bổ sung nếu cần, và quá trình tạo hạt được thực hiện để thu được chất dạng hạt. Chất dạng hạt thu được này được sấy bằng cách sử dụng máy sấy khay, máy sấy tầng sôi hoặc các loại tương tự, và được sàng được thực hiện bằng cách sử dụng máy nghiền hoặc máy dao động, nhờ đó có thể thu được hạt giải phóng kéo dài. Ngoài ra, đối với phương pháp sản xuất hạt giải phóng kéo dài trong sáng chế, có thể bổ sung ít nhất một dược chất, ít nhất một chất được chọn từ chất polyme không phụ thuộc vào độ pH và chất polyme phụ thuộc vào độ pH, và nếu cần chất pha loãng và chất kết dính sử dụng máy nén ép khô như máy nén ép trực cán hoặc máy tạo hạt dạng phôi, và thực hiện đúc ép trong khi trộn, và sau đó thực hiện tạo hạt bằng cách phá vỡ đến cỡ thích hợp. Chất dạng hạt được điều chế bằng cách sử dụng máy tạo hạt này có thể được sử dụng dưới dạng hạt hoặc hạt mịn theo sáng chế, hoặc có thể còn được phá vỡ bằng cách sử dụng máy nghiền công suất, máy tạo hạt trực cán, máy nghiền tốc độ roto hoặc các loại máy tương tự, và được sàng để thu được hạt giải phóng kéo dài. Lưu ý rằng hạt giải phóng ngay cũng có thể được sản xuất như đối với hạt giải phóng kéo dài.

Sản phẩm được đúc ép có thể được sản xuất dưới dạng phần giải phóng kéo dài hoặc phần giải phóng ngay chứa dược chất, hoặc dưới dạng chế phẩm được đề cập ở đây bằng cách sử dụng một phương pháp thông thường, hoặc sự kết hợp của các phương pháp thông thường. Ví dụ, ít nhất một dược chất, ít nhất một chất được chọn từ chất polyme không phụ thuộc vào độ pH và chất polyme phụ thuộc vào độ pH, chất pha loãng

như mannitol hoặc lactoza, chất kết dính như polyvinylpyrrolidon hoặc crystallin xenluloza, chất gây rã như carmelloza natri hoặc crospovidon, và chất bôi trơn như magie stearat hoặc đá tal được sử dụng, và bước tạo viên nén được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thông thường, do đó sản phẩm đúc ép có thể thu được. Trong trường hợp này, tạo viên nén là hoạt động chính trong phương pháp sản xuất sản phẩm đúc ép, nhưng hoạt động này có thể được kết hợp với các hoạt động khác như trộn, sấy, tạo thành lớp phủ đường, và phủ.

Ví dụ về phương pháp tạo viên nén bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, đúc ép trực tiếp trong đó ít nhất một dược chất và chất hỗ trợ được trộn với nhau và sau đó hỗn hợp này được đúc ép trực tiếp thành các viên nén bằng cách sử dụng máy tạo viên nén, và sự ép hạt nhỏ khô hoặc ép hạt nhỏ ẩm trong đó hạt giải phóng kéo dài hoặc hạt giải phóng ngay theo sáng chế được đưa vào quá trình đúc ép sau khi bổ sung chất bôi trơn hoặc chất gây rã nếu cần. Không có giới hạn cụ thể về máy tạo viên nén được sử dụng trong quá trình đúc ép; ví dụ, máy tạo viên nén dập đơn, máy tạo viên nén quay, hoặc máy tạo viên nén được phủ ép có thể được sử dụng.

Hạt giải phóng kéo dài hoặc hạt giải phóng ngay chứa dược chất, hoặc sản phẩm được đúc ép theo các phương án ở đây có thể được sử dụng dưới dạng hạt hoặc viên nén làm chế phẩm, nhưng cũng có thể được đưa vào xử lý thêm để sản xuất chế phẩm. Ví dụ, sản phẩm được đúc ép này hoặc các hạt có thể được phủ màng bằng cách sử dụng vật liệu nền màng như etylxenluloza, casein, metylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, copolyme axit metacrylic L, xenluloza axetat phtalat, nhựa cánh kiến hoặc các loại tương tự, hoặc cho phủ đường bằng cách sử dụng chất lỏng phủ đường chứa sacaroza, rượu đường, bột gôm arabic, bột talc hoặc các loại tương tự, do đó thu được các viên nén phủ màng hoặc viên nén phủ đường. Một dung môi trong kỹ thuật phủ này có thể là nước tinh khiết, nhưng dung môi hữu cơ như rượu, xeton, ete hoặc hydrocacbon được clo hóa, hoặc hỗn hợp của chúng cũng có thể được sử dụng. Ví dụ, etanol, axeton, metylen clorua hoặc các loại tương tự có thể được sử dụng làm dung môi hữu cơ. Hơn nữa, đối với thiết bị phủ, thiết bị thường được sử dụng trong các kỹ thuật phủ để sản xuất thuốc có thể được sử dụng, với các ví dụ bao gồm thiết bị phủ phun trong đó việc phủ được thực hiện bằng cách phủ chất lỏng phủ hoặc các loại tương tự, và máy tạo hạt tầng sôi roto để tạo lớp.

Trong trường hợp sản xuất các chế phẩm viên nang, chế phẩm viên nang có thể

được sản xuất bằng cách nạp đầy hạt giải phóng kéo dài hoặc hạt giải phóng ngay nêu trên, hoặc viên nén nhỏ vào viên nang gelatin cứng hoặc viên nang HPMC bằng cách sử dụng máy nạp viên nang tự động. Theo cách khác, trong trường hợp chế phẩm để dùng theo từng ống hoặc sirô khô được sử dụng trộn với nước hoặc loại tương tự khi dùng, hạt giải phóng kéo dài hoặc hạt giải phóng ngay nêu trên có thể được trộn với chất làm đặc hoặc chất gây rã để phân tán các hạt này, sau đó hỗn hợp này được tạo thành các hạt hoặc viên nén. Ngoài ra, chất lỏng hoặc thạch có thể được điều chế bằng cách sử dụng nước, và các chất được chọn từ chất gây rã, chất nhũ hóa, chất làm đặc, chất bảo quản, chất điều chỉnh độ pH, chất tạo hạt, chất tạo mùi vị, chất tạo hương và v.v. Tuy nhiên, đối với các phương pháp sản xuất khác, không có giới hạn đối với các dạng nêu trên.

Để các phương án được mô tả ở đây có thể được hiểu đầy đủ hơn, các ví dụ sau đây được nêu ra. Cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

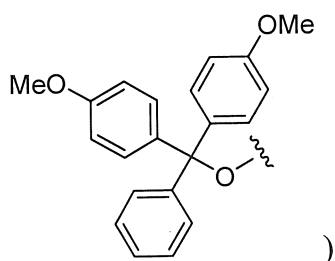
Các ký hiệu viết tắt dưới đây có thể được sử dụng xuyên suốt phần Ví dụ thực hiện sáng chế:

All: alyl

BOP: (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoni hexaflorophosphat

DMT: 4,4'-Dimetoxyltrityl

(DMTO-:



Bz: benzoyl

ib: isobutyryl

Bazơ Hunig: i-Pr₂NEt (diisopropyletylamin)

AllylOH: rượu allylic

OAll: $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$

ACN: axetonitril

All: $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2$

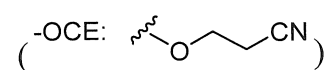
2-NitroBnBr: 2-nitrobenzyl bromua

Bz: benzoyl

ib: isobutyryl

i-Pr: isopropyl

CE: xyanoetyl

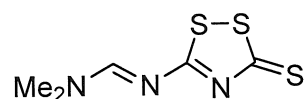


DEAD: dietyl azodicarboxylat

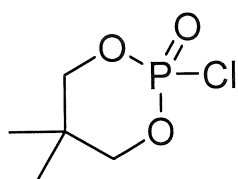
DIAD: diisopropyl azodicarboxylat

DCM: diclorometan

DDTT: N,N-dimetyl-N'-(3-thioxo-3H-1,2,4-dithiazol-5-yl)formimidamit

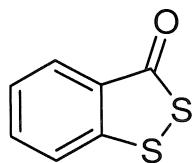


DMOCP: 2-cloro-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphinan 2-oxit



TBS: t-butyl dimethylsilyl

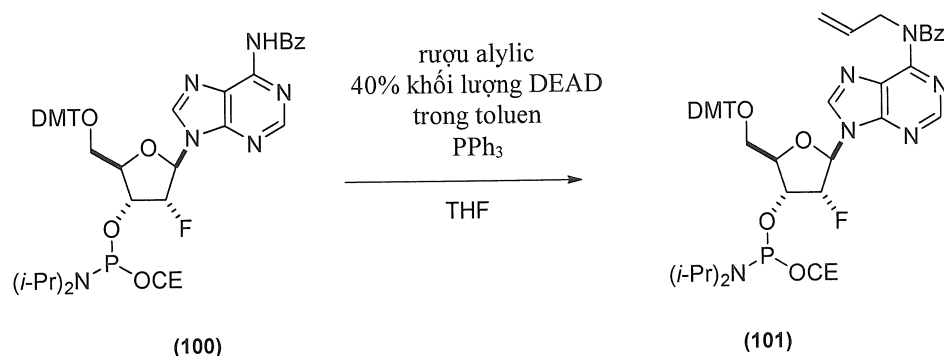
3H-benzo[c][1,2]dithiol-3-on:



Ví dụ 1 -- Tổng hợp Hợp chất 1a

Sơ đồ đầy đủ của quy trình tổng hợp này là có sẵn trên FIG. 1.

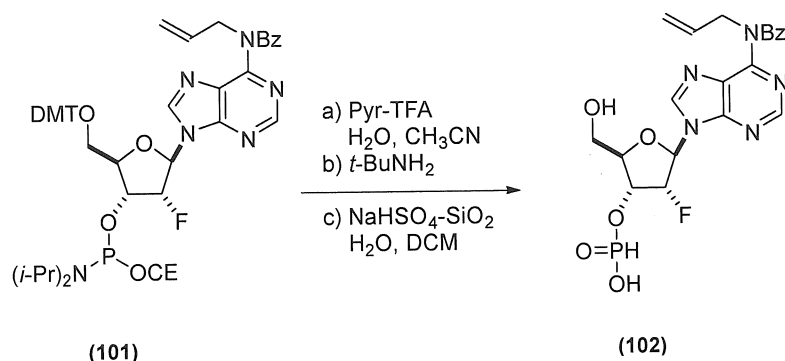
Bước A



Bổ sung DEAD (dung dịch 40% khối lượng trong toluen; 54,2 ml, 137 mmol, 1,5 đương lượng) vào hỗn hợp chứa (2R,3R,4R,5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-2-((bis(4-metoxyphenyl)(phenyl)metoxy)metyl)-4-florotetrahydrofuran-3-yl ((2-xyanoetyl) diisopropylphosphoramidit (Hợp chất 100) (hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang của phospho; 80,0 g, 91,332 mmol, 1 đương lượng, danh mục ChemGenes Corporation # ANP-9151), rượu allylic (9,63 ml, 142 mmol, 1,55 đương lượng) và triphenylphosphin (38,3 g, 146 mmol, 1,60 đương lượng) trong THF (1,1L) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh và phản ứng này được theo dõi bằng LC/MS. Khi hoàn thành (19 giờ), hỗn hợp này được cô trong chân không (35°C) và hỗn hợp tạo thành được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (800 g x 2 cột, 40 đến 60% EtOAc trong n-heptan được tạo đệm bằng triethylamin 0,5%) để thu được Hợp chất 101 dưới dạng bột màu trắng (84,2 g, hiệu suất định tính, hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang của phospho).

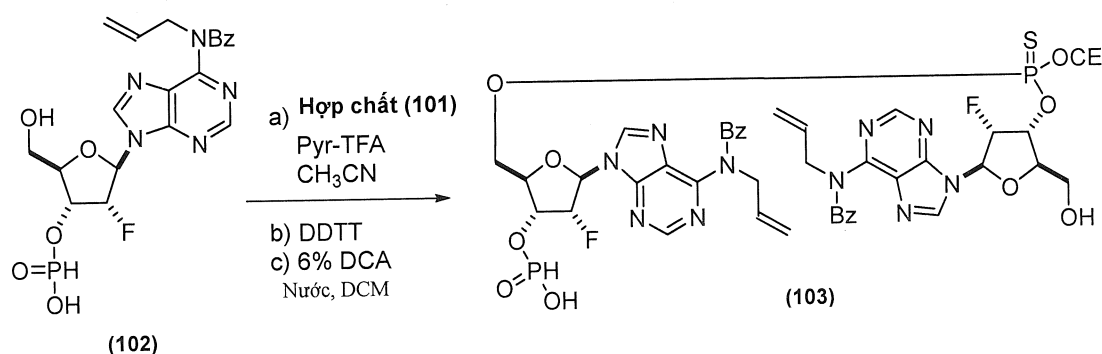
^1H NMR (hỗn hợp 3:2 của các chất đồng phân không đối quang của phospho, 400 MHz, CDCl_3) δ 1,14 - 1,21 (m, 12 H) 2,40 (t, $J=6,2$ Hz, 1,2 H) 2,59 (t, $J=6,2$ Hz, 0,8 H) 3,27 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H) 3,52 - 3,66 (m, 5 H) 3,78 (s 2,4 H) 3,79 (s 3,6 H) 4,28 - 4,34 (m, 1 H) 4,84 - 4,96 (m, 0,4 H) 4,99 (d, $J=5,5$ Hz, 2 H) 4,95 - 5,10 (m, 0,6 H) 5,05 (d, $J=10,9$ Hz, 1 H) 5,22 (br d, $J=17,6$ Hz, 1 H) 5,64 (br d, $J=53,2$ Hz, 0,6 H) 5,70 (br d, $J=51,6$ Hz, 0,4 H) 5,96 - 6,75 (m, 1 H) 6,20 (d, $J=16,0$ Hz, 0,6 H) 6,24 (d, $J=17,2$ Hz, 0,4 H) 6,74 - 6,79 (m, 4 H) 7,02 - 7,06 (m, 2H) 7,17 - 7,24 (m, 8 H) 7,32 - 7,34 (m, 2 H) 7,41 - 7,44 (m, 2 H) 8,11 (s, 1H) 8,52 (s, 0,4 H) 8,54 (s, 0,6 H).

Bước B



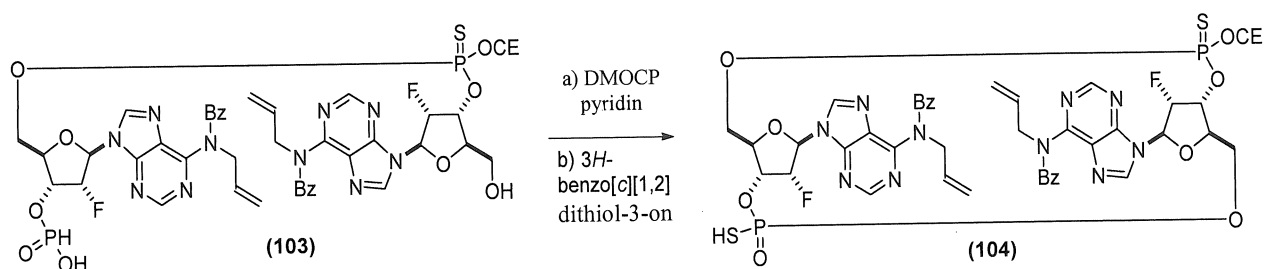
Bổ sung nước (0,118 ml, 6,55 mmol, 2,0 đương lượng) và muối pyridin trifloroaxetat (0,759 g, 3,93 mmol, 1,2 đương lượng) vào dung dịch chứa Hợp chất 101 (3,00 g, 3,28 mmol, 1 đương lượng) trong axetonitril (30 ml). Sau khi khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 1 phút, bổ sung *tert*-butylamin (14,5 g, 21,0 ml, 0,20 mol, 60 đương lượng). Sau khi phân tách hoàn toàn nhóm xianoethyl (được theo dõi bằng LC/MS), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được đun đồng sôi hai lần bằng axetonitril. Hỗn hợp thô này được hòa tan trong DCM (45,0 ml) và được xử lý bằng nước (0,118 ml, 6,55 mmol, 2,0 đương lượng) và NaHSO₄-SiO₂ (1,18 g, 6,55 mmol, 2 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi phân tách hoàn toàn nhóm DMT (được theo dõi bằng LC/MS, khoảng 1 giờ), hỗn hợp phản ứng này được lọc và được rửa hai lần bằng DCM/MeOH (9/1, 20 ml). Các chất lọc kết hợp này được cô trong chân không và được xử lý bằng hỗn hợp 1:1 của n-heptan/toluen (~30 ml). Lớp trên được loại bỏ bằng cách gạn. Thực hiện lặp lại một lần nữa bước thao tác như vậy với n-heptan/toluen (1/1, 30 ml) và lớp dưới được đun đồng sôi hai lần bằng axetonitril để thu được Hợp chất 102 (giả định hiệu suất lý thuyết 100%). Sản phẩm này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước C



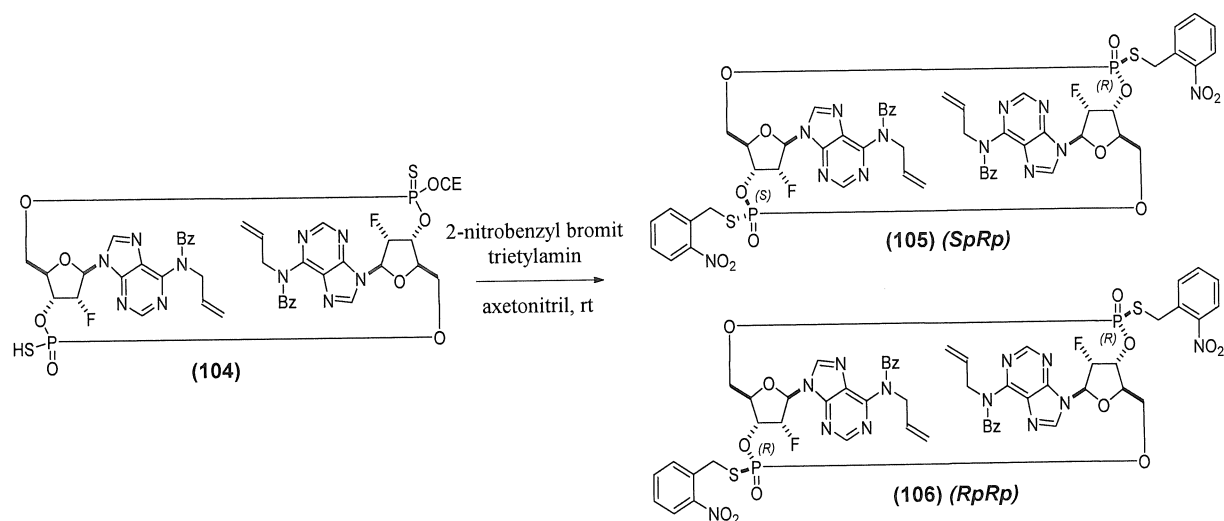
Bổ sung muối pyridin trifloroaxetat (được làm khô đồng sôi bằng pyridin; 0,760 g, 3,94 mmol, 1,25 đương lượng) vào hỗn hợp chứa Hợp chất 102 (1,56 g, 3,27 mmol, 1 đương lượng) và Hợp chất 101 (3,00 g, 3,28 mmol, 1 đương lượng) trong axetonitril (30 ml). Sau 5 phút, DDTT (0,840 g, 4,09 mmol, 1,30 đương lượng, danh mục ChemGenes Corporation # RN-1588) được bổ sung và, sau khi lưu hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS), hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong DCM (30 ml) và được xử lý bằng nước (0,57 ml, 32 mmol, 10 đương lượng) và axit dicloroaxetic 6% (1,56 ml, 18,9 mmol, 6,0 đương lượng) trong DCM (30 ml). Sau 20 phút, phản ứng được ngừng bằng pyridin (20 ml) và được cô trong chân không. Phần cặn được đun đồng sôi bằng pyridin để thu được Hợp chất 103 (3,22 g, giả định hiệu suất lý thuyết 100%). Sản phẩm này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước D



Bổ sung DMOCP (1,45 g, 7,88 mmol, 2,50 đương lượng) vào dung dịch chứa Hợp chất 103 (3,22 g, 3,15 mmol, 1 đương lượng) trong pyridin (100 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi quá trình đóng vòng lớn hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS), nước (1,7 ml, 94,5 mmol, x10 lần so với DMOCP) được bổ sung, tiếp theo là 3H-benzo[c][1,2]dithiol-3-on (0,795 g, 4,73 mmol, 1,5 đương lượng). Sau khi quá trình lưu hóa hoàn thành (khoảng 40 phút), hỗn hợp phản ứng này được cô một phần trong chân không đến khoảng 15 ml và được rót vào hỗn hợp Dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (50 ml) và nước (30 ml). Sau 10 phút khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh, hỗn hợp này được chiết bằng hỗn hợp 1:1 chứa EtOAc/MTBE (60 ml x 3 lần). Các lớp hữu cơ được kết hợp, được rửa bằng nước muối (25 ml), được làm khô trên Mg₂SO₄ và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (MeOH 0-20% trong DCM) để thu được Hợp chất 104 (3,31 g, 3,20 mmol, giả định hiệu suất lý thuyết 100%) dưới dạng dầu màu nâu. Sản phẩm này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước E



Bổ sung 2-nitrobenzyl bromua (2,42 g, 11,2 mmol, 3,50 đương lượng) và triethylamin (1,78 ml, 12,8 mmol, 4,00 đương lượng) vào dung dịch chứa Hợp chất 104 (3,31 g, 3,20 mmol, 1 đương lượng) trong axetonitril (66,2 ml). Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS, khoảng 20 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (60% etyl axetat/n-heptan đến etyl axetat 100%) để thu được 0,568 g sản phẩm dưới dạng hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang của phospho. Phép tách HPLC điều chế các chất đồng phân không đối quang thu được Hợp chất 105 (chất đồng phân *SR*; 0,225 g, 0,180 mmol, tổng hiệu suất 5,6% từ Hợp chất 101) và Hợp chất 106 (chất đồng phân *RR*; 0,187 g, 0,149 mmol, tổng hiệu suất 4,7% từ Hợp chất 1).

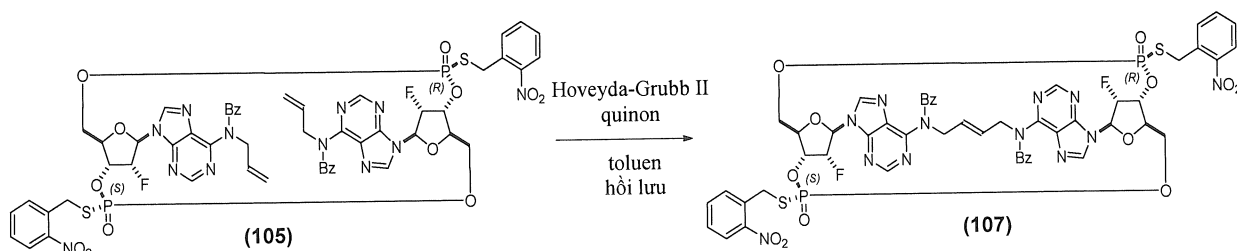
Hợp chất 105 (*SpRp*) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,63 (s, 1H), δ = 8,61 (s, 1H), 8,04 – 8,00 (m, 2H), 7,99 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,65 – 7,44 (m, 8H), 7,40 – 7,31 (m, 4H), 7,25 – 7,21 (m, 4H), 6,15 – 5,89 (m, 5H), 5,61 (dd, J = 52,0, 5,1 Hz, 1H), 5,55 (ddd, J = 51,2, 4,7, 2,7 Hz, 1H), 5,51 – 5,42 (m, 1H), 5,31 – 5,22 (m, 2H), 5,11 (dd, J = 3,9, 9,8 Hz, 2H), 5,04 – 4,95 (m, 4H), 4,55 – 4,37 (m, 7H), 4,29 – 4,12 (m, 3H)

Hợp chất 106 (*RpRp*) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,65 (s, 2H), 8,06 (dd, J = 1,4, 8,0 Hz, 2H), 7,98 (s, 2H), 7,57 – 7,52 (m, 6H), 7,47 – 7,32 (m, 6H), 7,25 – 7,21 (m, 4H), 6,15 (d, J = 18,7 Hz, 2H), 6,09 – 5,99 (m, 2H), 5,82–5,76 (m, 2H), 5,60 (dd, J = 51,8, 4,9 Hz, 2H), 5,27 (dd, J = 1,2, 17,2 Hz, 2H), 5,12 (dd, J = 1,0, 10,4 Hz, 2H), 5,06 – 4,96 (m, 4H), 4,55 – 4,40 (m, 4H), 4,36 – 4,24 (m, 4H), 4,21 – 4,02 (m, 2H)

Các điều kiện HPLC điều chế:

Trang thiết bị		Agilent 1200				
Cột HPLC		Cột Sunfire Prep C18 OBD nước, 5 μ m, 30 x 250 mm, #186003969				
Tốc độ dòng		50 ml/phút				
pha động		A: nước, B: axetonitril				
Gradient	Thời điểm (phút)	0	8	9,9	10	12
	B%	50	99	99	50	50
Thời gian chạy		12 phút				
Thể tích tiêm		150 μ l (0,08 g/ml trong axetonitril)				
Phát hiện		UV 254 nm				
Thời gian lưu	Hợp chất 105 (<i>SpRp</i>)	7,7 phút				
	Hợp chất 106 (<i>RpRp</i>)	8,0 phút				

Bước F

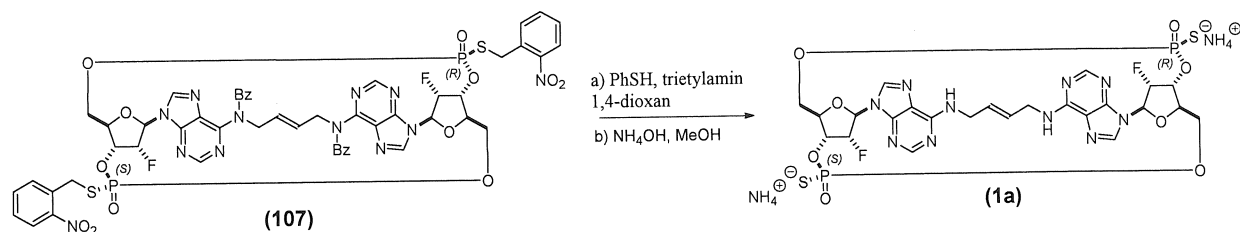


Bổ sung chất xúc tác Hoveyda-Grubbs Catalyst™ thế hệ thứ hai ((1,3-Bis-(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden)dichloro(o-isopropoxyphenylmetylen)ruteni; sẵn có tại danh mục SIGMA-ALDRITCH® số 569755; CAS 301224-40-8; 91 mg, 0,15 mmol, 0,35 đương lượng) và quinon (0,102 ml, 1,243 mmol, 3,0 đương lượng) vào dung dịch được gia nhiệt (90°C) chứa Hợp chất 105 (519 mg, 0,414 mmol, 1 đương lượng) trong toluen (519 ml). Hỗn hợp này được đun hồi lưu và quy trình phản ứng được theo dõi bằng LC/MS. Sau 3 giờ chất xúc tác bổ sung được bổ sung (91 mg, 0,15 mmol, 0,35 đương lượng) và phản ứng này được tiếp tục thêm trong 3 giờ. Sau khi làm mát xuống, hỗn hợp này được xử lý bằng DMSO (0,59 ml, 8,3 mmol, 20 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 15 giờ, được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO₂ 25g, etyl axetat 66% trong n-heptan đến etyl axetat 100%) để thu được Hợp chất 107 (200 mg, 0,163 mmol, hiệu suất 39%) dưới dạng bột khô màu nâu.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,19 (s, 1H), 8,12 (dd, J = 7,8 Hz, 1,9 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,63 (br d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,53 - 7,41 (m, 10H), 7,35 - 7,30 (m, 2H), 7,25 - 7,20 (m, 4H), 6,23 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 6,14 (d, J = 18,8 Hz, 1H), 5,86 - 5,75 (m, 1H), 5,75 (dt, J = 15,3, 5,0 Hz, 1H), 5,67 (dt, J = 15,3, 4,7

H_z, 1H), 5,60 (dd, $J = 52,0, 3,9$ Hz, 1H), 5,48 (dd, $J = 50,4, 3,9$ Hz, 1H) 5,50 – 5,39 (m, 1H), 4,91 - 4,64 (m, 4H), 4,57 - 4,25 (m, 9H), 4,15 (d, $J = 7,03$ Hz, 1H), 4,11 (d, $J = 7,03$ Hz, 1H).

Bước G



Bổ sung thiophenol (0,88 mL, 8,55 mmol, 119 đương lượng) và triethylamin (0,88 mL, 6,31 mmol, 88 đương lượng) vào dung dịch chứa Hợp chất 107 (88 mg, 0,072 mmol, 1 đương lượng) trong 1,4-dioxan (1,76 ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường. Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS, 13 giờ), metanol (5,28 ml) và amoni hydroxit 28% (3,52 ml) được bổ sung và hỗn hợp tạo thành được gia nhiệt đến 50°C. Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS, 5 giờ), hỗn hợp này được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh và huyền phù hơi nâu tạo thành được lọc và được rửa bằng nước (15 ml). Chất lọc này được lọc lại để loại bỏ các chất bổ sung. Các chất lọc cuối cùng được chiết hai lần bằng hỗn hợp 1:1 chứa toluen và heptan (30 ml). Lớp nước được cô trong chân không và sau đó được tái tạo huyền phù trong nước (6 ml). Chất rắn tạo thành được lọc ra và chất lọc này được cho qua HPLC điều chế để thu được muối diamoni Hợp chất 1 (còn được gọi là Hợp chất 1a) (39 mg, 0,050 mmol, hiệu suất 70%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 1a (*SpRp*, *trans*) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 9,05 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 6,34 (br s, 2H), 5,88 (br s, 2H), 5,66 (br d, $J = 51,6$ Hz, 1H), 5,59 (br d, $J = 52,2$ Hz, 1H) 5,01 (br s, 2H), 4,68 - 4,34 (m, 6H), 4,07 - 3,82 (m, 2H), 3,79 - 3,55 (m, 2H); ³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD) δ = 55,48 (s, 1P), 55,16 (s, 1P).

Các điều kiện HPLC điều chế của Hợp chất 1a:

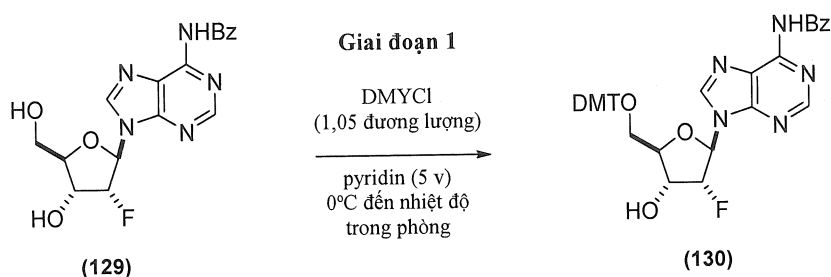
Trang thiết bị	Agilent 1200/1260 AS/FC
Cột HPLC	XBridge C18 nước, 10 x 100 mm, # 1413
Tốc độ dòng	3,0 ml/phút
Nhiệt độ cột	35°C

pha động	A: NH ₄ OH 0,1% trong nước, B: NH ₄ OH 0,1% trong axetonitril
Gradient (B%)	0 → 50
Thời gian chạy	20 phút
Thể tích tiêm	50 μ l (4 mg/ml trong nước)
Phát hiện	UV 260 nm
Thời gian lưu	6,5 phút

Ví dụ 1.1 -- Quy trình tổng hợp thay thế cho Hợp chất 1a

Quy trình tổng hợp thay thế cho Hợp chất 1a được thể hiện trên FIG. 2A và FIG. 2B, cũng như trên FIG. 2C và được báo cáo dưới đây.

Giai đoạn 1

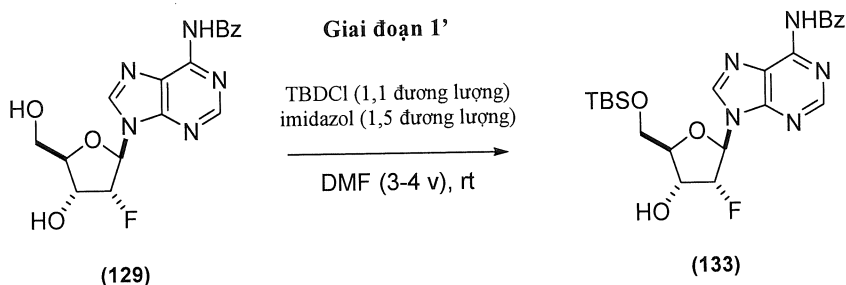


Hợp chất 129 (570 g, 1,53 mol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) được hòa tan trong pyridin (2,85 L, 35,2 mol, 4,89 khối lượng, 5,0 thể tích, 23 đương lượng). Hỗn hợp này được làm mát đến 2,6°C và được xử lý bằng 4,4'-dimetoxylitryl clorua (DMTCl; 543 g, 1,60 mol, 0,953 khối lượng, 1,05 đương lượng). Hỗn hợp này được khuấy ở 0 đến 5°C trong 2 giờ và sau đó được để ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Phản ứng này được theo dõi bằng LC/MS và sự chuyển hóa hoàn toàn được xác nhận sau khi khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được làm mát đến dưới 5°C và được ngừng bằng cách xử lý bằng MeOH (124 ml, 3,05 mol, 0,172 khối lượng, 0,217 thể tích, 2,0 đương lượng) trong 15 phút. Hỗn hợp này được đồng bay hơi bằng toluen (2,00 L, 3,04 khối lượng, 3,51 thể tích) trong chân không và sau đó được pha loãng bằng hỗn hợp của EtOAc (2,850 L, 4,5 khối lượng, 5,0 thể tích) và n-heptan (2,85 L, 3,42 khối lượng, 5,0 thể tích). Lớp hữu cơ được rửa bằng NaHCO₃ bão hòa (dung dịch 9% khối lượng trong nước; 2,0 L, 3,5 thể tích). EtOAc bổ sung (2,85 L, 4,5 khối lượng, 5,0 thể tích) được bổ sung để hòa tan hoàn toàn sản phẩm thô. Sau khi được khuấy trong 5 phút, hai lớp này được tách ra. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước (2,0 L, 3,5 khối lượng, 3,5 thể tích). Chất rắn bắt đầu kết tủa từ từ ra khỏi lớp hữu cơ. Lớp nước này được tách. Sau đó, lớp hữu cơ này được cô đến khoảng 1 thể tích. Sản phẩm thô này được tạo huyền

phù bằng hỗn hợp chứa n-heptan (2,00 L, 2,40 khối lượng, 3,51 thể tích) và toluen (0,50 L, 0,76 khối lượng, 0,88 thể tích). Sau khi khuấy trong 15 phút, chất rắn màu vàng nhạt được thu gom bằng cách lọc trong chân không. Bánh lọc này được rửa liên tiếp bằng: (1) hỗn hợp chứa n-heptan (0,60 L, 0,72 khối lượng, 1,05 thể tích) và toluen (0,30 L, 0,46 khối lượng, 0,53 thể tích), và sau đó (2) n-heptan (3,00 L, 3,6 khối lượng, 5,26 thể tích). Chất rắn này được làm khô không dùng nhiệt trong 30 phút và sau đó được chuyển sang các khay để làm khô ở 50°C trong lò chân không qua đêm để thu được Hợp chất 130 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (996,7 g, 1,47 mol, 1,75 khối lượng, hiệu suất 97%).

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,99 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 8,04 - 8,00 (m, 2H), 7,64 - 7,59 (m, 1H), 7,57 - 7,50 (m, 2H), 7,41 - 7,36 (m, 2H), 7,32 - 7,15 (m, 7H), 6,83 - 6,76 (m, 4H), 6,31 (dd, J = 2,5, 17,0 Hz, 1H), 5,68 (ddd, J = 2,3, 4,7, 52,7 Hz, 1H), 4,88 - 4,77 (m, 1H), 4,26 - 4,21 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,57 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,43 (dd, J = 4,1, 10,7 Hz, 1H), 2,60 (br s, 1H)

Giai đoạn 1'

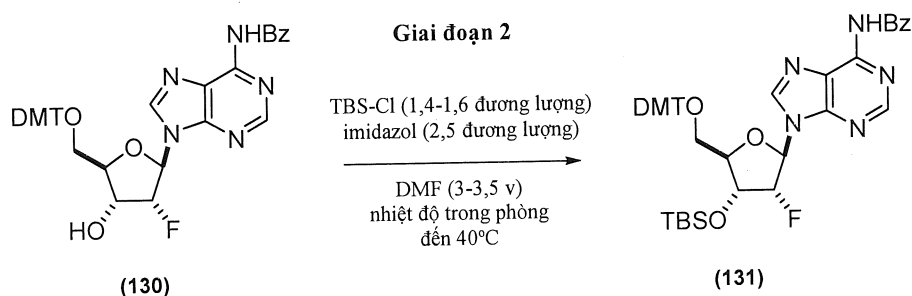


Hợp chất 129 (430 g, 1,15 mol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) và imidazol (118 g, 1,73 mol, 0,274 khối lượng, 1,50 đương lượng) được hòa tan trong DMF (1,72 L, 3,78 khối lượng, 4,0 thể tích) và hỗn hợp tạo thành được làm mát đến 5°C. TBS-Cl (191 g, 1,27 mol, 0,444 khối lượng, 1,10 đương lượng) được bổ sung. Hỗn hợp này được khuấy tại 0 đến 11°C trong 2 giờ, cho phép làm ấm từ từ đến nhiệt độ môi trường xung quanh (quá trình này được theo dõi bằng LCMS). Phản ứng này được hoàn thành trong 6 giờ sau khi bổ sung TBS-Cl, nhưng được phép khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong thêm 20 giờ. Hỗn hợp này được làm mát đến 2°C và được xử lý bằng metanol (93 ml, 74 g, 2,3 mol, 0,17 khối lượng, 0,22 khối lượng, 2,0 đương lượng) trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng hỗn hợp chứa MTBE (1,72 L, 1,23 kg, 2,96 khối lượng, 4,0 thể tích) và EtOAc (1,72 L, 1,55 kg, 3,60 khối

lượng, 4,0 thể tích) tiếp theo là NH_4Cl bão hòa (dung dịch 28% khối lượng trong nước; 2,15 L, 5,0 thể tích). Các chất rắn bắt đầu rơi từ từ ra khỏi dung dịch. Hỗn hợp này được để ấm đến 24°C và nước (1,08 L, 1,08 kg, 2,5 khối lượng, 2,5 thể tích) được bổ sung vào (T bên trong = 22°C). Nhiều chất rắn hơn bắt đầu kết tủa khỏi hỗn hợp này. Nước bổ sung (1,08 L, 1,08 kg, 2,5 khối lượng, 2,5 thể tích) và MTBE (1,40 L, 1,04 kg, 2,4 khối lượng, 3,3 thể tích) được bổ sung vào hỗn hợp này. Chất rắn màu trắng nhờ được thu gom bằng cách lọc trong chân không. Bình phản ứng được rửa bằng nước (320 ml, 0,74 thể tích) và sau đó là MTBE (1,80 L, 1,33 kg, 3,10 khối lượng, 4,19 thể tích) để chuyển chất rắn còn lại bất kỳ sang thiết bị lọc. Bánh lọc này được rửa liên tiếp bằng: (1) nước (1,80 L, 1,80 kg, 4,2 khối lượng, 4,2 thể tích), (2) nước (1,80 L, 1,80 kg, 4,2 khối lượng, 4,2 thể tích), (3) hỗn hợp chứa MTBE (0,90 L, 0,67 kg, 1,5 khối lượng, 2,1 thể tích) và *n*-heptan (0,90 L, 0,62 kg, 1,4 khối lượng, 2,1 thể tích), (4) hỗn hợp chứa MTBE (0,90 L, 0,67 kg, 1,5 khối lượng, 2,1 thể tích) và *n*-heptan (0,90 L, 0,62 kg, 1,4 khối lượng, 2,1 thể tích). Chất rắn được thu hồi được làm khô trong chân không ở 40°C trong 2 ngày để thu được Hợp chất 133 dưới dạng chất rắn màu trắng (483 g, 0,991 mol, 1,12 khối lượng, hiệu suất 86%).

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,97 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,04 - 8,00 (m, 2H), 7,64 - 7,58 (m, 1H), 7,56 - 7,51 (m, 2H), 6,40 (dd, J = 2,3, 16,0 Hz, 1H), 5,45 (ddd, J = 2,7, 4,3, 53,1 Hz, 1H), 4,75 - 4,66 (m, 1H), 4,22 - 4,17 (m, 1H), 4,07 (dd, J = 2,3, 11,7 Hz, 1H), 3,91 (dd, J = 2,7, 11,7 Hz, 1H), 2,38 (dd, J = 2,7, 7,0 Hz, 1H), 0,92 (s, 9H), 0,11 (s, 3H), 0,11 (s, 3H).

Giai đoạn 2

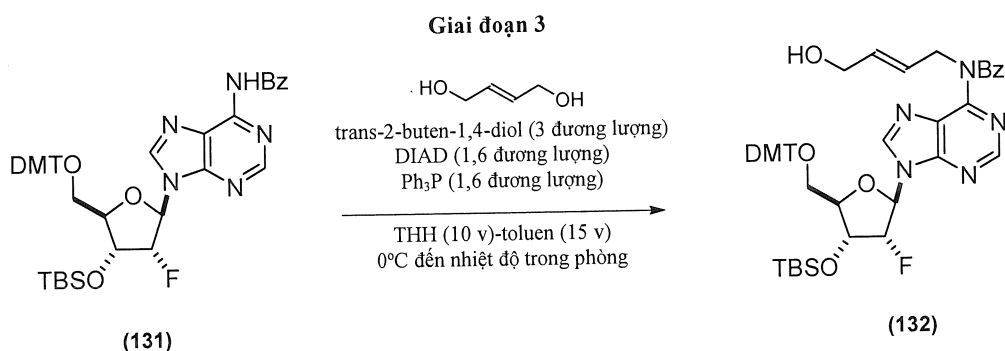


Hợp chất 130 (993 g, 1,47 mol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) và imidazol (150 g, 2,20 mol, 0,151 khối lượng, 1,5 đương lượng) được hòa tan trong DMF (3,48 L, 3,28 kg, 3,3 khối lượng, 3,5 thể tích) và hỗn hợp này được làm mát đến 5°C . TBS-Cl (244 g, 1,62 mol, 0,245 khối lượng, 1,10 đương lượng) được bổ sung. Hỗn hợp

phản ứng được khuấy ở 0 đến 5°C trong 2 giờ, được để ấm từ từ đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được theo dõi bằng LCMS. Sau 17 giờ, imidazol bổ sung (100 g, 1,47 mol, 0,10 khối lượng, 1,0 đương lượng) và TBS-Cl (111 g, 735 mmol, 0,112 khối lượng, 0,50 đương lượng) được bổ sung và được tiếp tục khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 2 giờ và tại 35°C trong 2 giờ. Hỗn hợp tạo thành này được làm mát đến 13,6°C và được xử lý bằng MeOH (119 ml, 2,94 mol, 2 đương lượng) trong 10 phút. Trong bình phản ứng phân tách được bổ sung đá (5 kg, 5 khối lượng) và NH₄Cl bão hòa (dung dịch 28% khối lượng trong nước; 5,0 L, 5 thể tích). Hỗn hợp phản ứng này được bổ sung vào hỗn hợp đá/NH₄Cl. Chất rắn màu trắng nhờ bắt đầu kết tủa khỏi dung dịch ngay lập tức. 2kg đá bổ sung (2 kg, 2 khối lượng) và nước (3,0 L, 3 thể tích) được bổ sung vào hỗn hợp này. Bình phản ứng được rửa bằng nước (0,50 L, 0,5 thể tích) và chất tẩy rửa được bổ sung vào hỗn hợp. n-heptan (2,00 L, 2 thể tích) được bổ sung vào hỗn hợp và tiếp tục khuấy trong 10 phút. Chất rắn màu trắng nhờ được thu gom bằng cách lọc trong chân không. Bánh lọc này được rửa bằng: (1) nước (4,0 L, 4,0 thể tích), (2) nước (4,0 L, 4,0 thể tích), (3) n-heptan (4,0 L, 4,0 thể tích), (4) n-heptan (4,0 L, 4,0 thể tích). Chất rắn được thu hồi được làm khô trong chân không tại 45°C trong 4 ngày để thu được Hợp chất 131 dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ (1,095 kg, 1,39 mol, 1,10 khối lượng, hiệu suất 94%).

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 9,09 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,02 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,63 - 7,59 (m, 1H), 7,55 - 7,50 (m, 2H), 7,37 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,29 - 7,17 (m, 7H), 6,79 (d, J = 7,9 Hz, 4H), 6,29 (dd, J = 2,9, 16,2 Hz, 1H), 5,60 (ddd, J = 2,7, 3,9, 53,1 Hz, 1H), 4,78 (ddd, J = 4. 7, 6,4, 15,8 Hz, 1H), 4,26 - 4,22 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,58 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,26 (dd, J = 3,7, 10,7 Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,02 (s, 3H)

Giai đoạn 3

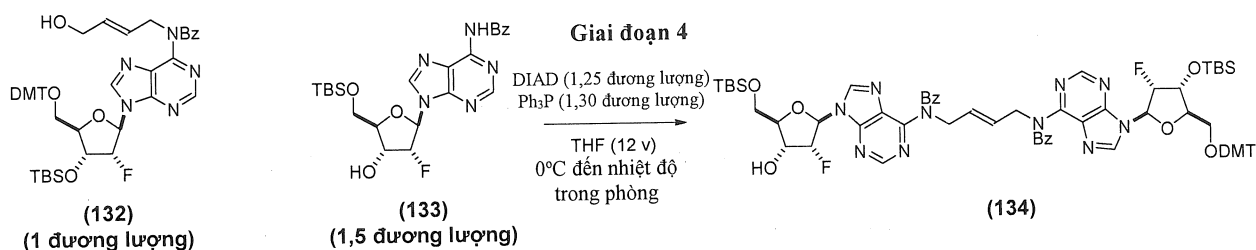


Hợp chất 131 (1000 g, 1,27 mol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) và trans-2-buten-1,4-diol (olefin hình học được xác nhận bằng $^1\text{H-NMR}$; 335 g, 3,80 mol, 0,335 khối lượng, 3,0 đương lượng) được đun đồng sôi hai lần bằng THF (3,0 L, 3,0 thể tích). Phần cặn được hòa tan trong hỗn hợp chứa THF (10 L, 10 thể tích) và toluen (15 L, 15 thể tích). Triphenylphosphin (432 g, 1,65 mol, 0,432 khối lượng, 1,3 đương lượng) được bổ sung và sau đó hỗn hợp phản ứng này được làm mát đến -5°C . DIAD (0,320 L, 1,65 mol, 333 g, 0,333 khối lượng, 0,320 thể tích, 1,3 đương lượng) được bổ sung từ từ trong 20 phút trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 5°C . Phản ứng này được khuấy ở 0 đến 5°C trong 1 giờ và được theo dõi bằng LCMS. Bể đá được loại bỏ và hỗn hợp này được để ấm đến nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy qua đêm (17 giờ), triphenylphosphin (83 g, 0,32 mol, 0,083 khối lượng, 0,25 đương lượng) và DIAD (62 ml, 0,32 mol, 64 g, 0,064 khối lượng, 0,062 thể tích, 0,25 đương lượng) được bổ sung. Sau khi thêm 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp phản ứng được lọc bằng MTBE (10 L, 10 thể tích), được rửa hai lần bằng NaCl bão hòa (dung dịch 18% khối lượng trong nước; 2 x 4L) và được cô trong chân không thành dầu đặc. Hỗn hợp này được tái hòa tan trong hỗn hợp chứa MTBE (4,00 L, 4 thể tích) và n-heptan (0,50 L, 0,5 thể tích) và sau đó được làm mát đến 0°C . Tinh thể hạt của triphenylphosphin oxit được bổ sung vào dung dịch. Các chất rắn bắt đầu kết tủa từ từ ra khỏi dung dịch và được khuấy qua đêm. Chất rắn màu trắng này được thu gom bằng cách lọc trong chân không và được rửa bằng MTBE (2 L, 2 thể tích) để tách 540 g triphenylphosphin oxit. Chất lọc này được cô và được tinh chế qua Biotage 150L KP-Sil (SiO_2 5 kg; được xử lý sơ bộ bằng TEA 1% trong Hep/etOAc; các dung môi rửa giải: heptan/EtOAc (48 L chứa EtOAc 33% với TEA 1%, 24 L chứa EtOAc 50% với TEA 1%, 24 L chứa EtOAc 66% với TEA 1%) $\rightarrow$ EtOAc 100% với TEA 1%). Cột được theo dõi bằng TLC (2:1 EtOAc/n-heptan). Các phân đoạn sản phẩm sạch được kết hợp và được cô trong chân không để thu được Hợp chất 132 dưới dạng chất rắn bột màu trắng nhạt (634 g, chứa 14% khối lượng đồng sản phẩm thu được từ DIAD, khối lượng tinh 545 g, 0,63 mol, hiệu suất được điều chỉnh 50%). Các phân đoạn hỗn hợp được kết hợp và được cô trong chân không để thu được chất rắn bột màu vàng nhạt (750 g), mà được đưa vào quá trình tái tinh chế qua Biotage 150M HP-Sphere (2,5 kg SiO_2 ; được xử lý sơ bộ bằng TEA 1% trong Hep/EtOAc; mẫu được tải bằng toluen, các dung môi rửa giải: Hep/EtOAc/TEA 1% (12 L chứa EtOAc 50% với TEA 1%, 16L EtOAc 66% với TEA 1%) $\rightarrow$ EtOAc với TEA 1%). Cột được

theo dõi bằng TLC (2/1/0,03 EtOAc/n-hep/TEA). Các phân phân đoạn sản phẩm sạch được kết hợp và được cô trong chân không để thu được Hợp chất 132 bổ sung dưới dạng chất rắn bột màu trắng nhạt (206 g, 0,24 mol, hiệu suất 18%).

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,58 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,43 - 7,37 (m, 2H), 7,32 - 7,28 (m, 2H), 7,24 - 7,15 (m, 8H), 7,03 - 6,98 (m, 2H), 6,78 - 6,73 (m, 4H), 6,18 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,88 (td, J = 5,5, 15,6 Hz, 1H), 5,77 (td, J = 5,1, 15,6 Hz, 1H), 5,60 (ddd, J = 2,7, 4,3, 53,1 Hz, 1H), 5,03 - 4,96 (m, 2H), 4,91 (ddd, J = 4,5, 6,6, 16,6 Hz, 1H), 4,18 - 4,14 (m, 1H), 3,88 - 3,82 (m, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,52 (dd, J = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,14 (dd, J = 3,5, 10,9 Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

Giai đoạn 4

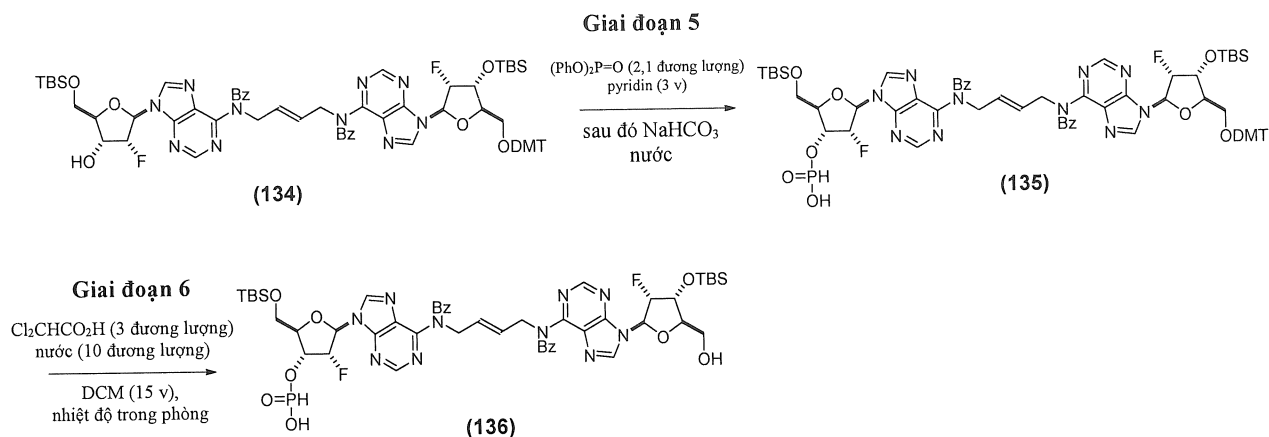


Hợp chất 132 (800 g, 0,930 mol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) và Hợp chất 133 (522 g, 1,07 mol, 0,652 khối lượng, 1,15 đương lượng) được làm khô đồng sôi bằng THF (2 x 3 L, 2 x 3,8 thể tích) và được tái hòa tan trong THF (9,60 L, 8,45 kg, 12,0 thể tích) ở nhiệt độ trong phòng. Triphenylphosphin (317 g, 1,21 mol, 0,396 khối lượng, 1,30 đương lượng) được bổ sung và hỗn hợp này được làm mát dưới -5°C . DIAD (226 ml, 1,16 mol, 235 g, 0,294 khối lượng, 0,283 thể tích, 1,25 đương lượng) được bổ sung nhiệt độ bên trong dưới 7°C . Hỗn hợp phản ứng này được để ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau 21 giờ, hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không thành dầu đặc, được đun đồng sôi bằng n-heptan (2,00, 1,37 kg, 1,71 khối lượng, 2,50 thể tích) và sau đó được tái hòa tan trong hỗn hợp chứa MTBE (2,40 L, 1,78 kg, 2,2 khối lượng, 3,0 thể tích) và n-heptan (800 ml, 547 g, 0,68 khối lượng, 1,0 thể tích). Hỗn hợp này được tạo mầm kết tinh bằng triphenylphosphin oxit và được làm mát đến 5°C , được hòa tan bằng n-heptan (400 ml, 274 g, 0,34 khối lượng, 0,50 thể tích) và được khuấy tại 5°C trong 30 phút. Chất kết tủa rắn màu trắng được thu gom bằng cách lọc trong chân không và được rửa bằng hỗn hợp 2:1 (thể tích/thể tích) của MTBE và n-Heptan (1,8 L) để thu được triphenylphosphin oxit (455 g). Chất lọc

được cô trong chân không và được tinh chế qua Biotage 150 L KP-Sil (SiO₂ 5 kg; được xử lý sơ bộ bằng TEA 1%; mẫu được tải bằng cách hòa tan trong toluen các dung môi rửa giải: 9:1 heptan/EtOAc (16 L) và 15 TEA, 3,6:1 (46 L), 2:1 (20 L) và TEA 1%, 1:1 (30 L) và TEA 1%, và EtOAc 100% (16 L) và TEA 1%). Các phân đoạn sản phẩm sạch được kết hợp này được cô trong chân không để thu được Hợp chất 134 dưới dạng bột rắn màu trắng nhò (662,2 g). Các phân đoạn hỗn hợp được kết hợp và được cô trong chân không (480 g). Chất rắn không hòa tan màu trắng được tạo thành bởi sự pha loãng với toluen (300 ml) trước khi tải trên Biotage 150L được loại bỏ bằng cách lọc trong chân không. Nguyên liệu hòa tan trong toluen được tinh chế qua Biotage 150M HP-Sphere (SiO₂ 2,5 kg (được xử lý sơ bộ bằng TEA 1%); tải mẫu bằng toluen; các chất rửa giải: 2:1 heptan/EtOAc (26 L) khối lượng/ TEA 1%, 1:1 (25 L) khối lượng/ TEA 1%, 1:4 (34 L) khối lượng/ TEA 1%). Cột được theo dõi bằng TLC (1:1 heptan/EtOAc). Các phân đoạn sản phẩm sạch kết hợp được cô trong chân không để thu được Hợp chất 134 bổ sung dưới dạng bột rắn màu trắng nhò (165,5 g. Tổng cộng 662,2+165,5 g = 827,7 g, 930 mmol, 1,03 khối lượng, hiệu suất 67%).

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,47 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,38 - 7,31 (m, 5H), 7,27 - 7,19 (m, 6H), 7,14 - 7,06 (m, 3H), 6,93 - 6,87 (m, 2H), 6,76 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 6,26 (dd, J = 2,0, 16,0 Hz, 1H), 6,15 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,86 (dd, J = 4,7, 15,2 Hz, 1H), 5,80 (dd, J = 4,7, 15,2 Hz, 1H), 5,51 (ddd, J = 2,7, 4,3, 52,8 Hz, 1H), 5,31 (ddd, J = 2,0, 4,3, 52,8 Hz, 1H), 4,87 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 4,85 - 4,81 (m, 1H), 4,79 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 4,71 - 4,59 (m, 1H), 4,20 - 4,13 (m, 2H), 4,06 (dd, J = 2,7, 11,3 Hz, 1H), 3,90 (dd, J = 2,7, 11,7 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,52 (dd, J = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,18 (dd, J = 3,9, 10,9 Hz, 1H), 0,92 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 6H), 0,07 (s, 3H)

Giai đoạn 5-6

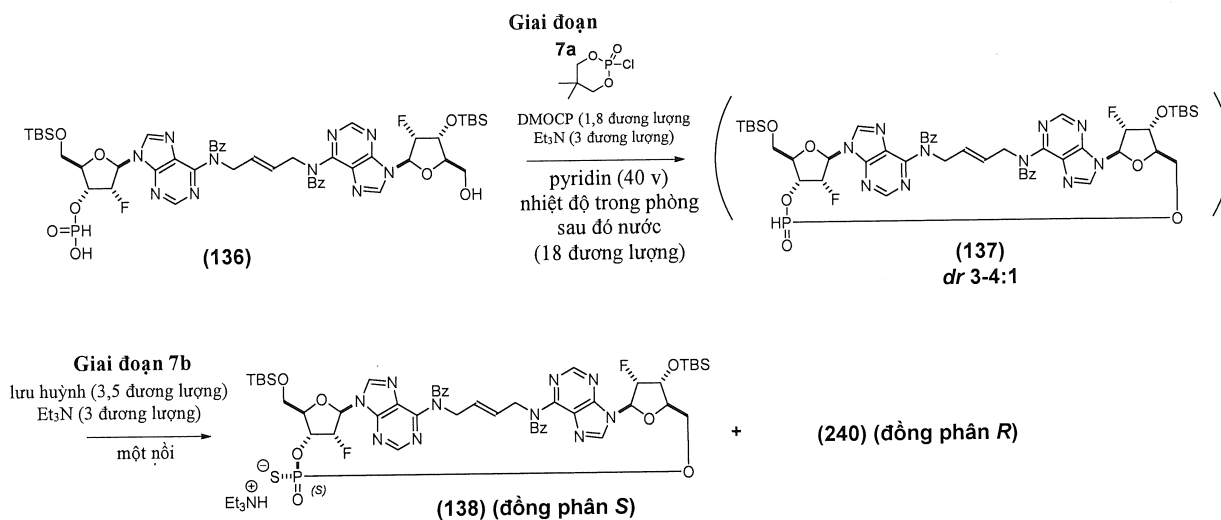


Bổ sung diphenyl phosphit (90 ml, 109 g, 0,46 mol, 0,26 khối lượng, 0,22 thể tích, 1,5 đương lượng) vào dung dịch chứa Hợp chất 134 (410,7 g, 309 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) trong pyridin (1,23 L, 1,21 kg, 15,2 mol, 2,9 khối lượng, 3,0 thể tích, 49 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng và được theo dõi bằng LCMS. Sau 2 giờ (chuyển hóa 80%) diphenyl phosphit bổ sung (29,9 ml, 36,2 g, 155 mmol, 0,088 khối lượng, 0,073 thể tích, 0,50 đương lượng) được bổ sung. Sau khi thêm 1 giờ diphenyl phosphit bổ sung (6,0 ml, 7,2 g, 31 mmol, 0,018 khối lượng, 0,015 thể tích, 0,10 đương lượng) được bổ sung và phản ứng được tiếp tục trong 0,5 giờ nữa (chuyển hóa 98%). Hỗn hợp phản ứng được bổ sung vào hỗn hợp chứa NaHCO_3 bão hòa (dung dịch 9% khối lượng trong nước; 2,1 L, 5 thể tích) và nước (1,0 L ml, 2,5 thể tích) trong khi giữ nhiệt độ bên trong từ 4,7 đến 12°C. Bình phản ứng được rửa bằng thể tích nhỏ của EtOAc. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và được theo dõi phản ứng bằng LCMS (chuyển hóa 100%). Hỗn hợp phản ứng được chiết hai lần bằng hỗn hợp 1:1 chứa EtOAc và MTBE (2 x 8,2 L, 2 x 20 thể tích). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (4,1 L, 10 thể tích), được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng toluen (3 x 4,1 L, 3 x 10 thể tích; cấp liên tục) để loại bỏ pyridin để thu được Hợp chất 135 (0,55 đương lượng pyridin còn lại).

Giai đoạn 6 - Hợp chất 135 thô được hòa tan trong diclorometan (3,08 L, 4,07 kg, 9,9 khối lượng, 7,5 thể tích) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Nước (55,7 ml, 0,136 thể tích, 10 đương lượng) được bổ sung, tiếp theo là dung dịch chứa axit dicloroaxetic (77 ml, 120 g, 0,93 mol, 0,29 khối lượng, 0,19 thể tích, 3,0 đương lượng) trong DCM (3,08 L, 7,5 thể tích) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 25°C. (Chuyển thành dung dịch màu cam). Sau 30 phút, triethylsilan (Et_3SiH ; 494 ml, 359 g, 3,09 mol, 0,875 khối lượng, 1,20 thể tích, 10,0 đương lượng) (Nhiệt độ bên trong đi từ 18,2°C đến

17°C) được bổ sung và tiếp tục khuấy trong 20 phút. Triethylamin (431 ml, 313 g, 3,09 mol, 0,762 khối lượng, 1,05 thể tích, 10,0 đương lượng) được bổ sung (Nhiệt độ bên trong đi từ 17,8°C đến 22°C). Hỗn hợp được cô thành 1,55 kg (3,8 khối lượng), được tái hòa tan trong EtOAc (6,2L, 5,5 kg, 14 khối lượng, 15 thể tích), được rửa liên tiếp bằng: (1) nước (1,0 L, 2,5 thể tích) và NaHCO₃ bão hòa (dung dịch 9% khối lượng trong nước, 0,82 L, 2,0 thể tích). Dung dịch EtOAc sản phẩm thô được bảo quản ở -20°C qua đêm.; 0,82 L, 2,0 thể tích) và vào ngày tiếp theo, dung dịch được cô trong chân không ở 25°C. Do đó, hỗn hợp thô thu được (654 g) được tán nhỏ bằng: (1) n-heptan (3,01 L, 7,5 thể tích), (2) hỗn hợp chứa n-heptan (2,46 L, 6,0 thể tích) và toluen (0,82 L, 2,0 thể tích). Phần dung dịch (dịch nổi) được gạn ra và chất rắn còn lại ở đáy được hòa tan trong axetonitril (4,1 L, 10 thể tích). Hỗn hợp được cô trong chân không ở 25°C và được đun đồng sôi bằng axetonitril hai lần để thu được Hợp chất 136. Sản phẩm này được sử dụng cho giai đoạn tiếp theo mà không tinh chế (giả định hiệu suất lý thuyết 100%).

Giai đoạn 7



Giai đoạn 7a: Hợp chất 136 (337 g, 309 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) được hòa tan trong pyridin khan (13,5 L, 13,2 kg, 39 khối lượng, 40 thể tích) ở nhiệt độ trong phòng. Triethylamin (129 ml, 927 mmol, 94 g, 0,28 khối lượng, 0,38 thể tích, 3,0 đương lượng) được bổ sung, tiếp theo là 2-cloro-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphinan 2-oxit (DMOCOP; 103 g, 556 mmol, 0,31 khối lượng, 1,80 đương lượng). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút và được theo dõi bằng LCMS (chuyển hóa 100%) để tạo thành Hợp chất 137.

Giai đoạn 7b: TEA (129 ml, 927 mmol, 94 g, 0,28 khối lượng, 0,38 thể tích, 3,0 đương lượng), nước (100 ml, 5,56 mol, 0,30 khối lượng, 0,30 khối lượng, 18 đương

lượng) và lưu huỳnh (34,7 g, 1,08 mol, 0,10 khối lượng, 3,5 đương lượng) được bổ sung vào hỗn hợp nêu trên của Hợp chất 137. Sau 90 phút (chuyển hóa 100%), NaHCO_3 (dung dịch 9% khối lượng trong nước; 3,37 L, 10 thể tích) được bổ sung trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 30°C ($16,6^\circ\text{C}$ đến 27°C). Hỗn hợp tạo thành được lọc để loại bỏ các muối. Chất lọc được cô hỗn hợp này trong chân không, được hòa tan bằng MTBE (5,1 L, 15 thể tích), và rửa hai lần bằng NaCl (dung dịch 30% khối lượng trong nước; 2 x 1,35 L, 2 x 4 thể tích). Các chất rắn không hòa tan được lọc ra và chất lọc được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng toluen (4,0 L, 12 thể tích). Chất tạo thành được loại bỏ bằng cách lọc và hỗn hợp thô này được hòa tan trong toluen và được tinh chế qua Biotage 150L KP-Sil (SiO_2 5 kg; được xử lý sơ bộ bằng Hep/EtOAc/TEA (1,5/1,5/0,03 CV); được rửa giải bằng: EtOAc/TEA (3/0,03 CV), EtOAc/MeOH/TEA (4/0,2/0,04 CV), EtOAc/MeOH/TEA (2/0,2/0,02 CV) Cột được theo dõi bằng TLC (EtOAc/MeOH/TEA=9/1/0,1). Các phân đoạn chứa đồng phân *Sp* được kết hợp và được cô trong chân không để thu được Hợp chất 138 dưới dạng chất rắn bột màu hồng nhạt (chất đồng phân *Sp*; 154 g, 128 mmol, 0,46 khối lượng, hiệu suất 41,3%). Các phân đoạn chứa đồng phân *Rp* được kết hợp và được cô trong chân không để thu được Hợp chất 240 dưới dạng chất rắn bột màu hồng nhạt (chất đồng phân *Rp*; 64 g, 53 mmol, 0,19 khối lượng, hiệu suất 17%).

Hợp chất 138 (chất đồng phân *Sp*):

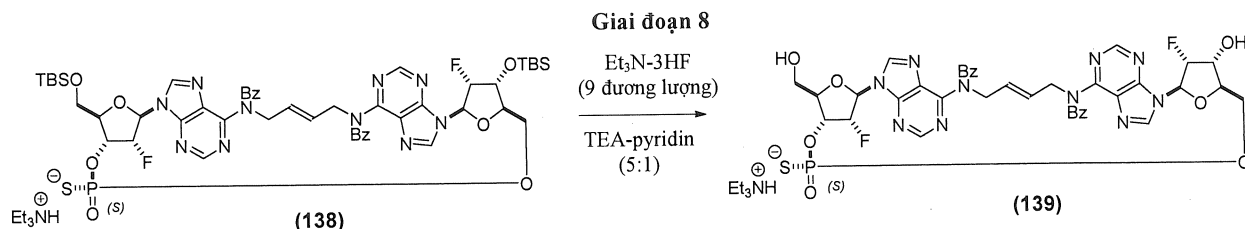
^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*) δ = 8,51 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,49 – 7,44 (m, 2H), 7,38 - 7,27 (m, 4H), 7,25 - 7,21 (m, 2H), 7,14 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 6,44 (dd, J = 2,5, 13,9 Hz, 1H), 6,18 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 5,78 (td, J = 6,3, 15,6 Hz, 1H), 5,69 (td, J = 4,7, 15,6 Hz, 1H), 5,56 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 1H), 5,20 - 5,06 (m, 1H), 4,95 - 4,79 (m, 4H), 4,69 (dd, J = 4,3, 16,0 Hz, 1H), 4,54 - 4,38 (m, 3H), 4,35 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 4,32 - 4,29 (m, 1H), 4,05 (dd, J = 1,6, 11,7 Hz, 1H), 3,91 (dd, J = 3,1, 11,7 Hz, 1H), 3,14 - 3,06 (m, 6H), 1,30 (t, J = 7,4 Hz, 9H), 0,91 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,12 (s, 3H), 0,08 (s, 3H), 0,06 (s, 3H), 0,05 (s, 3H)

Hợp chất 240 (chất đồng phân *Rp*):

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*) δ = 8,54 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,39 - 7,09 (m, 10H), 6,39 (dd, J = 2,3, 14,1 Hz, 1H), 6,13 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 5,72 (d, J = 3,1 Hz, 2H), 5,68 (dd, J = 4,3, 51,2 Hz, 1H), 5,43 - 5,29 (m, 1H), 5,10 - 4,96

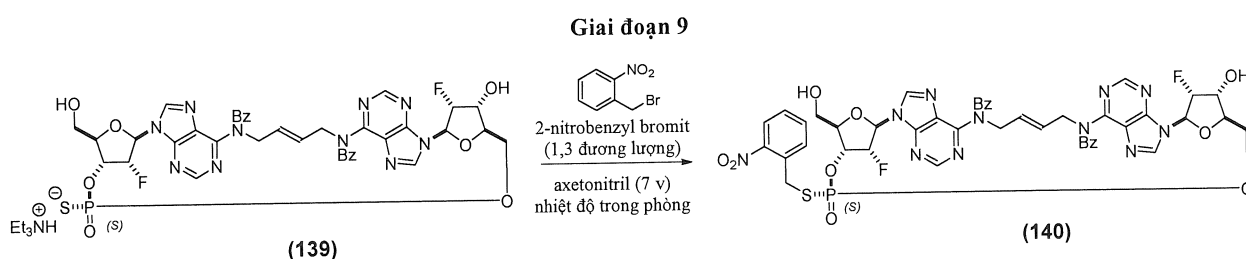
(m, 3H), 4,90 - 4,83 (m, 2H), 4,78 - 4,72 (m, 1H), 4,52 (ddd, $J = 3,9, 6,6, 17,2$ Hz, 1H), 4,44 - 4,35 (m, 2H), 4,31 - 4,26 (m, 1H), 4,20 - 4,12 (m, 2H), 3,87 (dd, $J = 3,5, 11,7$ Hz, 1H), 3,79 - 3,77 (m, 1H), 3,15 - 3,09 (m, 6H), 1,33 (t, $J = 7,4$ Hz, 9H), 0,94 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 0,13 (s, 3H), 0,12 (s, 3H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 3H)

Giai đoạn 8



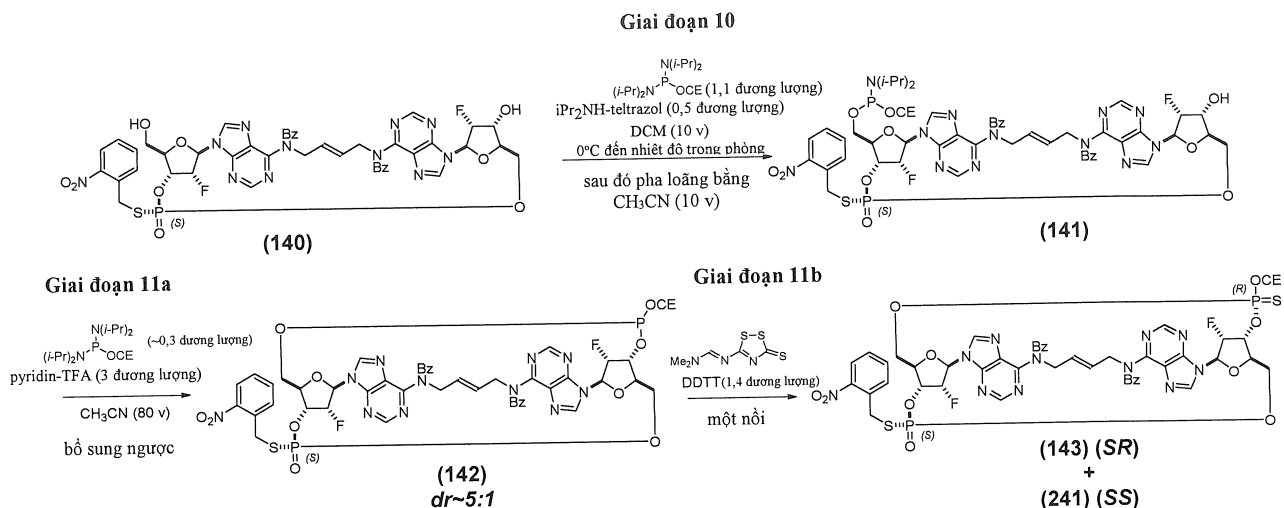
Hợp chất 138 (221 g, 183 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) được hòa tan trong hỗn hợp chứa pyridin (530 ml, 6,56 mol, 519 g, 2,3 khối lượng, 2,4 thể tích) và TEA (2,65 L, 19,0 mol, 1,93 kg, 8,7 khối lượng, 12 thể tích, 104 đương lượng). Triethylamin trihydroflorua (264 ml, 1,62 mol, 262 g, 1,2 khối lượng, 1,2 thể tích, 8,9 đương lượng dưới dạng phức hợp, 27 đương lượng HF) được bổ sung và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khi sự chuyển hóa được theo dõi bằng LCMS. Sau 3 giờ (chuyển hóa 97%), metoxytrimetylsilan (TMSOMe; 1,40 L, 10,2 mol, 1,06 kg, 4,8 khối lượng, 6,3 thể tích, 55 đương lượng) được bổ sung và tiếp tục khuấy trong 30 phút. Chất rắn dính phủ bình phản ứng. Phần dung dịch (dịch nổi) được gạn ra. Chất rắn được tán nhỏ hai lần bằng toluen (2 x 2,2 L, 2 x 10 thể tích; dịch nổi được gạn ra). Chất rắn thô còn lại trong bình phản ứng được hòa tan trong diclorometan (2,2 L, 10 thể tích) và được rửa bằng NH_4Cl (dung dịch 28% khối lượng trong nước; 2,2 L, 10 thể tích) và được rửa bằng NH_4Cl (dung dịch 28% khối lượng trong nước; 2,2 L, 10 thể tích). Lớp nước được chiết ngược bằng diclorometan (2,2 L, 10 thể tích). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng hỗn hợp chứa NaCl (dung dịch 36% khối lượng trong nước; 1,1 L, 5 thể tích) và nước (1,1 L, 5 thể tích), và sau đó được cô trong chân không để thu được Hợp chất 139 dưới dạng bột khô màu nâu (152 g, 155 mmol, 0,70 khối lượng, hiệu suất 85%). Sản phẩm thô được đưa vào bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Giai đoạn 9



Hợp chất 139 (150 g, 153 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) được đun đồng sôi bằng axetonitril (4 L, 27 thể tích) và sau đó được tái hòa tan trong axetonitril (1,05 L, 0,83 kg, 5,5 khối lượng, 7,0 thể tích) ở nhiệt độ trong phòng. 2-Nitrobenzyl bromua (44,4 g, 205 mmol, 0,30 khối lượng, 1,34 đương lượng) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng và phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau 23 giờ (chuyển hóa 100%), EtOAc (1,50 L, 10 thể tích), NH_4Cl (dung dịch 28% khối lượng trong nước; 300 ml, 2 thể tích) và nước (300 ml, 2 thể tích) được bổ sung ($\text{pH} = 6$) và hỗn hợp tạo thành được cô một phần trong chân không ở 25°C đến khối lượng 1,11 kg. EtOAc (2,25 L, 15 thể tích) được bổ sung và hỗn hợp này được khuấy trong 5 phút. Hai lớp được tách ra. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat (750 ml, 5 thể tích). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa liên tiếp bằng: (1) hỗn hợp chứa NaCl (dung dịch 36% khối lượng trong nước; 300 ml, 2 thể tích) và nước (300 ml, 2 thể tích) và (2) nước (600 ml, 4 thể tích). Lớp hữu cơ sau đó được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng n-heptan (1,50 L, 10 thể tích). MTBE (0,95 L, 6,3 thể tích) được bổ sung vào chất rắn thô và hỗn hợp này được gia nhiệt ở 40°C . Hỗn hợp này được hòa tan bằng EtOAc (300 ml, 2 thể tích) và được làm mát từ từ đến 0°C . Chất rắn đặc được phép để lắng và dịch nổi được bơm khỏi qua ống thủy tinh lọc. Chất rắn được rửa hai lần bằng MTBE (2 x 300 ml, 2 x 2 thể tích; dịch nổi được bơm khỏi qua ống thủy tinh lọc mỗi lần) và được làm khô trong chân không ở 40°C qua đêm để thu được Hợp chất 140 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (156 g). Chất lọc được cô trong chân không thu được dầu màu nâu (17,8 g), mà được đưa vào quá trình tinh chế qua Biotage Snap-Ultra 340 g (các dung môi rửa giải: MeOH 0 đến 5% trong EtOAc) để thu được Hợp chất 140 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (5,8 g). Tổng cộng $156\text{ g} + 5,8\text{ g} = 161,8\text{ g}$ (lượng thực 152 mmol, tinh khiết 95%, hiệu suất 99%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,46 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,09 - 8,06 (m, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,54 - 7,51 (m, 1H), 7,49 - 7,45 (m, 4H), 7,37 - 7,28 (m, 3H), 7,24 - 7,19 (m, 3H), 7,16 - 7,11 (m, 2H), 6,22 (d, $J = 16,8\text{ Hz}$, 1H), 6,14 (dd, $J = 2,7, 17,2\text{ Hz}$, 1H), 5,83 - 5,61 (m, 3H), 5,60 - 5,48 (m, 1H), 5,07 (dd, $J = 3,5, 51,6\text{ Hz}$, 1H), 5,06 - 4,96 (m, 1H), 4,79 (dd, $J = 4,9, 15,8\text{ Hz}$, 1H), 4,69 (d, $J = 5,9\text{ Hz}$, 2H), 4,67 - 4,56 (m, 1H), 4,48 - 4,40 (m, 3H), 4,37 - 4,30 (m, 1H), 4,27 (d, $J = 5,9\text{ Hz}$, 2H), 4,19 - 4,13 (m, 1H), 3,93 - 3,85 (m, 1H), 3,85 - 3,78 (m, 1H)



Giai đoạn 10: Hợp chất 140 (độ tinh khiết 95%, khối lượng thực 73,2 g, 72,3 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) và 2-xyanoetyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit (25,3 ml, 79,5 mmol, 0,33 khối lượng, 0,35 thể tích, 1,10 đương lượng) được đun đồng sôi bằng axetonitril khan ba lần (3 x 2 L), được tái hòa tan trong diclorometan (0,73 L, 10 thể tích) và được làm mát đến 0-5°C. Diisopropylamoni tetrazolit (6,19 g, 36,1 mmol, 0,085 khối lượng, 0,50 đương lượng) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng tạo thành được khuấy tại 0°C trong 10 giờ, được làm ấm đến 10°C trong 2 giờ, được giữ tại 10°C trong 10 giờ và được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Phản ứng được theo dõi bằng LCMS và TLC (EtOAc với TEA 0,5%). Sau 18 giờ, axetonitril khan (0,73 L, 10 thể tích) được bổ sung và hỗn hợp này được bảo quản ở -20°C trong 3 ngày.

Giai đoạn 11a: Hỗn hợp từ Giai đoạn 10 được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được bổ sung qua phễu nhỏ giọt theo phần (100 mL mỗi 30 phút, trong 9 giờ) vào hỗn hợp chứa muối pyridin trifloroaxetat (được đun đồng sôi trước bằng pyridin hai lần; 41,9 g, 217 mmol, 0,57 khối lượng, 3,0 đương lượng) và axetonitril (5,85 L, 80 thể tích). Phản ứng này được theo dõi bằng LCMS. Sau 13 giờ, dung dịch chứa 2-xyanoetyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit (5,8 mL, 18 mmol, 0,25 đương lượng) trong axetonitril (24 mL) được bổ sung trong 4 giờ. Lượng chất phản ứng bổ sung được xác định trên Hợp chất 140 còn lại (~30% dựa vào LCMS). Sự chuyển hóa nhiều hơn của diol được quan sát thấy sau 6 giờ.

Giai đoạn 11b: ((Dimethylaminometylidene)amino)-3H-1,2,4-dithiazolin-3-thion (DDTT; 20,8 g, 101 mmol, 0,28 khối lượng, 1,4 đương lượng) được bổ sung và tiếp tục khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô một phần đến ~800 mL và được hòa tan

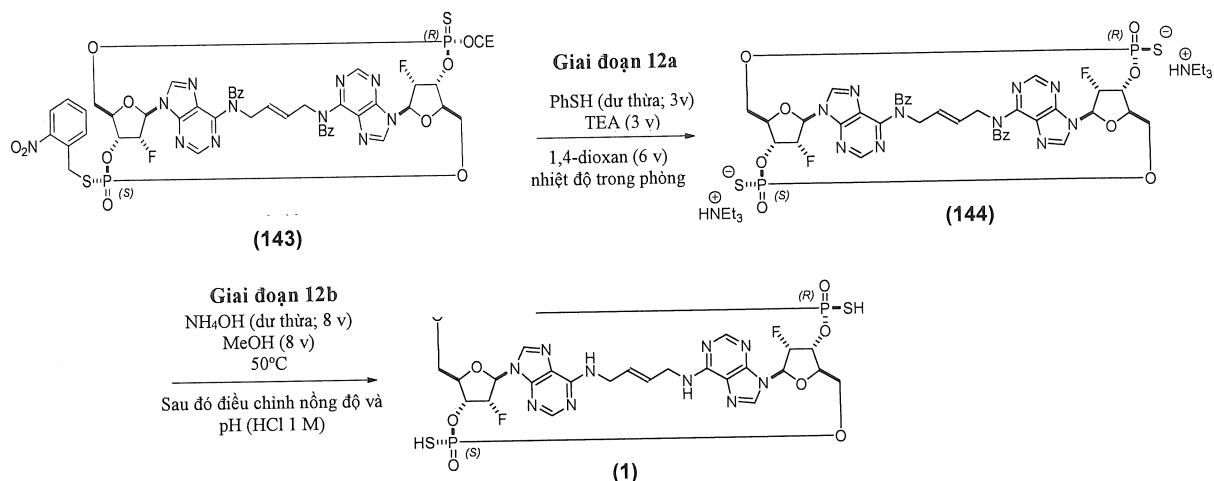
bằng MTBE (1,46 L, 20 thể tích), NaHCO₃ (dung dịch 9% khối lượng trong nước; 1,1 L, 15 thể tích) và nước (0,37 L, 5 thể tích). Độ pH=8. Các lớp được tách và lớp nước được chiết bằng hỗn hợp chứa MTBE (1,46 L, 20 thể tích) và EtOAc (1,10 L, 15 thể tích). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa hai lần bằng 30% NaCl nước (2 x 0,73 L, 2 x 10 thể tích), được cô trong chân không tại 35°C và được đun đồng sôi bằng toluen (1,46 L, 20 thể tích). LCMS và TLC (EtOAc) chỉ ra Hợp chất 143 (SpRp, được mong muốn): Hợp chất 241 (SpSp) = 5 : 1

Sản phẩm thô được tinh chế qua Biotage 150M KP-Sil, (SiO₂ 2,5 kg; các dung môi rửa giải: EtOAc/Hep: 2:1 (4 CV), 3:1 (2,5 CV), 4:1 (2,5 CV), EA 100% (3 CV), MeOH 5-10% trong EA 4 CV) để thu được Hợp chất 143 (36 g, 31,5 mmol, hiệu suất 44%).

Hợp chất 143 (SpRp): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,59 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,03 - 7,99 (m, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,56 - 7,53 (m, 2H), 7,49 - 7,40 (m, 5H), 7,35 - 7,28 (m, 2H), 7,24 - 7,16 (m, 4H), 6,92 (s, 1H), 6,29 (d, J = 14,9 Hz, 1H), 6,08 (d, J = 20,7 Hz, 1H), 5,97 - 5,83 (m, 1H), 5,76 (td, J = 4,7, 15,6 Hz, 1H), 5,61 - 5,51 (m, 2H), 5,40 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 5,29 - 5,17 (m, 1H), 4,91 (dd, J = 7,4, 14,9 Hz, 1H), 4,86 - 4,75 (m, 3H), 4,63 (dd, J = 3,7, 9,2 Hz, 1H), 4,58 - 4,43 (m, 5H), 4,34 - 4,19 (m, 4H), 2,79 (td, J = 5,9, 16,8 Hz, 1H), 2,66 (td, J = 6,3, 16,8 Hz, 1H).

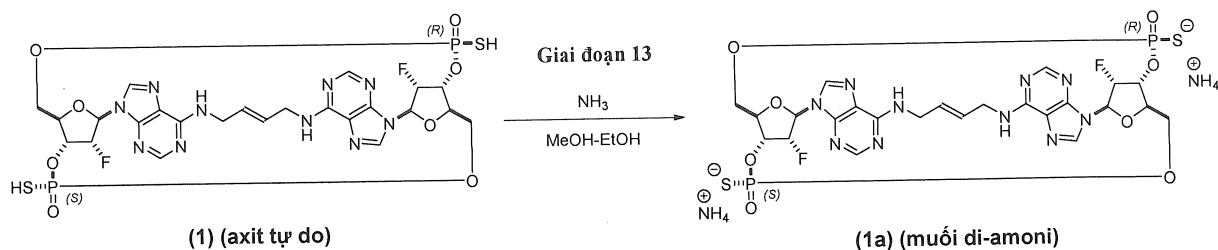
Hợp chất 241 (SpSp) ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,11 (s, 1H), 8,03 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,56 - 7,40 (m, 7H), 7,33 - 7,28 (m, 2H), 7,23 - 7,17 (m, 4H), 6,22 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 6,15 (d, J = 18,8 Hz, 1H), 5,85 (dd, J = 3,5, 51,2 Hz, 1H), 5,75 - 5,45 (m, 5H), 4,95 - 4,23 (m, 14H), 2,82 (t, J = 6,1 Hz, 2H).

Giai đoạn 12



Hợp chất 143 (71,6 g, 62,6mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) được hòa tan trong 1,4-dioxan (0,43 L, 6 thể tích). Thiophenol (215 ml, 2,09 mol, 230 g, 3,2 khối lượng, 3 thể tích, >30 đương lượng) được bổ sung, tiếp theo là triethylamin (215 ml, 1,54 mol, 156 g, 2,2 khối lượng, 3 thể tích). Một số sự tỏa nhiệt nhẹ được quan sát thấy (Nhiệt độ bên trong tăng $\sim 7^\circ\text{C}$), do đó bể nước/đá được sử dụng để làm mát và kiểm soát nhiệt độ bên trong dưới 27°C . Phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau 2 giờ, MeOH (0,57 L, 8 thể tích) và NH_4OH (28% khối lượng; 15 mol, 0,57 L, 8 thể tích, >200 đương lượng) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được gia nhiệt ở 50°C trong 5 giờ, được làm mát đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy qua đêm. Sau 14 giờ, nước (0,72 L, 10 thể tích) được bổ sung (không quan sát thấy chất rắn) và hỗn hợp này được chiết ba lần bằng hỗn hợp 1:1 (thể tích/thể tích) của n-heptan và toluen (3 x 0,86 L, 3 x 12 thể tích), tiếp theo là bằng toluen (0,57 L, 8 thể tích). Lớp nước được cô trong chân không tại $40\text{-}50^\circ\text{C}$ và được hòa tan bằng nước (1,07 L, 15 thể tích). Huyền phù tạo thành được giữ qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Chất rắn tạo thành được lọc ra, được rửa bằng nước (0,36 L, 5 thể tích). Chất lọc vẫn vẫn đục và được lọc qua giấy lọc xelit và bộ lọc Kuno. Độ vẫn đục vẫn còn. HCl (dung dịch 1,0 M trong nước; 132 ml, 132 mmol, 2,1 đương lượng) được bổ sung trong 1 giờ và pH được kiểm tra ($\text{pH} < 2$). Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và hỗn hợp này được lọc. Bánh lọc được rửa bằng nước (8 x 0,20 L), được làm khô trong lò chân không tại 35°C trong 2 ngày và không nóng trong 1 ngày để thu được Hợp chất 1 dưới dạng chất rắn màu cam nhạt (44,88 g, 60,1 mmol, 0,63 khối lượng, hiệu suất 96%).

Giai đoạn 13



Bổ sung amoniac (dung dịch 2,0M trong MeOH; 220 ml, 440 mmol, 10 thể tích, 15 đương lượng) vào axit tự do là Hợp chất 1 (22,42 g, 30,03 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng). EtOH (55 ml, 2,5 thể tích) được bổ sung và dung dịch tạo thành được lọc qua bộ lọc Kuno (0,45 micro mét; PTFE), rửa bằng hỗn hợp 1:1 (thể tích/thể tích) của MeOH và EtOH (90 mL, 4 thể tích). Chất lọc được cô trong chân không ở 30°C thu được chất rắn màu trắng nhò, mà được làm khô ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, được nghiền bằng thìa (dễ vỡ) và được làm khô thêm trong chân không ở nhiệt độ trong phòng. Chất rắn phân lập sau đó được tạo huyền phù trong toluen (250 ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Chất rắn sau đó được thu gom bằng cách lọc trong chân không và được rửa bằng toluen hai lần (2 x 50 ml). Chất rắn này sau đó được làm khô trong chân không trong lò chân không để thu được 22,4 g Hợp chất 1a (muối di-amoni của Hợp chất 1).

Quá trình tái kết tinh: Hợp chất 1a (22,14 g, 28,36 mmol, 1 khối lượng, 1 thể tích, 1 đương lượng) được hòa tan trong hỗn hợp chứa nước (664 ml, 30 thể tích) và amoni hydroxit (28% khối lượng; 2,5 ml, 18 mmol, 0,63 đương lượng) (pH = 9-10) và được chiết bằng toluen ba lần (3 x 300 ml, 3 x 14 thể tích), EtOAc ba lần (3 x 200 ml, 3 x 9 thể tích) và toluen ba lần (3 x 300 ml, 3 x 14 thể tích). Lớp nước tạo thành được xử lý bằng HCl (dung dịch 1,0 M trong nước; 90 ml, 90 mmol, 3,2 đương lượng) trong khoảng thời gian 3,5 giờ (pH ≤ 2). Hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút và sau đó chất kết tủa rắn được thu gom bằng cách lọc trong chân không. Bánh lọc này được rửa bằng nước ba lần (3 x 200 ml, 3 x 9 thể tích) và được làm khô trong chân không qua đêm. Amoni (dung dịch 2,0 M trong MeOH; 250 ml, 500 mmol, 17,6 đương lượng) và etanol (100 ml) được bổ sung vào chất rắn và hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không tới khi các tinh thể xuất hiện (~100 ml), tại thời gian đó bước cô được ngừng và hỗn hợp được khuấy trong 20 phút. Etanol (45 mL) được bổ sung và hỗn hợp được cô một phần (45 mL được loại bỏ). Hoạt động như vậy được lặp lại thêm hai lần, và sau đó hỗn hợp được làm mát đến 0°C và được khuấy trong 3,5 giờ. Chất rắn màu trắng được thu bằng cách

lọc trong chân không và được rửa bằng etanol mát (20 ml) tiếp theo là etyl axetat (2 x 50 mL). Chất rắn màu trắng được làm khô trong chân không ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày để thu được Hợp chất 1a dưới dạng chất rắn màu trắng (16,6 g, 21,3 mmol, 0,75 khối lượng, hiệu suất 75%). Chất lọc được cô trong chân không và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày để thu được Hợp chất 1a dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ (4,16 g, 5,3 mmol, hiệu suất 18%).

Ví dụ 1.2 – Phân tích ^1H NMR của Hợp chất 1

Phổ ký ^1H NMR của Hợp chất 1a được thể hiện trên FIG. 3. Quang phổ thu được là:

Quang phổ ^1H -NMR (400MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} 2,49 ppm, 80°C)

$\delta(\text{ppm})$: 3,05-3,13(4H, m), 3,70(1H, dd, $J=13$, 5 Hz), 3,78(1H, dd, $J=12$, 4Hz), 4,21-4,24(2H, m), 4,28(1H, m), 4,38(1H, m), 4,53-4,68(2H, m), 5,22(1H, m), 5,76(2H, s), 5,78(1H, m), 6,26(1H, m), 6,29(1H, m), 8,13(1H, s), 8,14(1H, s), 8,36(1H, brs), 8,59(1H, brs).

Ví dụ 1.3 – Phân tích tia X của Hợp chất 1

Khoảng 2 mg Hợp chất 1 được hòa tan trong 600 μL chứa nước. 120 μL chứa dung dịch này được đặt trong bình thủy tinh khác và sau đó bình này được bảo quản trong vật chứa cố định với 3 mL MeCN ở nhiệt độ trong phòng trong 1 tuần. Đây là phương pháp khuếch tán bay hơi $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ của điều chế mẫu.

Tinh thể đơn hình khối không màu ($0,1 \times 0,1 \times 0,1$ mm) được tìm thấy trong dung dịch kết tinh được phân tán trong Parabar 10312 lỏng và được gắn trên Dual-Thickness MicroMountsTM (MiTeGen). Số liệu khuếch tán được thu thập ở -160°C trên XtaLAB PRO P200 MM007HF (Rigaku) với phương pháp dao động trục ω bằng cách sử dụng bức xạ Cu-K α monocrom hóa phản chiếu đa lớp.

FIG. 4A thể hiện hình ORTEP của các phân tử Hợp chất 1 theo đơn vị không đối xứng, cùng với nhiều phân tử nước hỗn độn. FIG. 4B thể hiện cấu trúc tinh thể của một trong số các phân tử Hợp chất 1 từ FIG. 4A. FIG. 4C thể hiện cấu trúc tinh thể của phân tử khác của Hợp chất 1 được thể hiện trên FIG. 4A.

Cấu trúc tinh thể của Hợp chất 1 được hòa tan với hệ số R cuối cùng là 0,1354. Tham số Flack gần bằng không (0,083(17)), chỉ ra rằng cấu hình tuyệt đối của Hợp chất

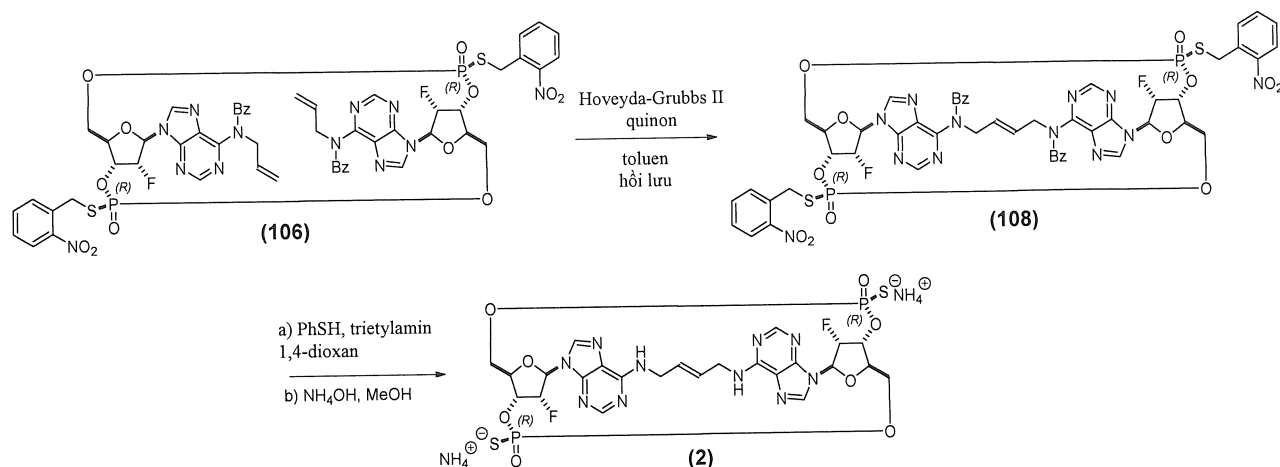
1 là (*R*, *S*). Phân tích cấu trúc tinh thể cũng chỉ ra rằng nhiều phân tử nước có mặt trong kênh lớn của Hợp chất 1, chỉ ra rằng phân tử nước cũng có thể dễ dàng trượt ra khỏi kênh này. Phân tích này cũng được khẳng định rằng hình thể của cả hai phân tử độc lập về mặt tinh thể học đơn vị bất đối xứng này hầu như giống nhau.

Các tham số khác của phân tích tia X được thể hiện dưới đây:

Nhiệt độ	113 K
Bước sóng	1,54184 Å
Hệ tinh thể, Nhóm không gian	Đơn nghiêng, $P2_1$
Tham số mạng	$a = 8,1584(3)$ Å
	$b = 35,451(2)$ Å
	$c = 15,9146(6)$ Å
	$\beta = 91,313(3)^\circ$
Thể tích	$4601,7(4)$ Å ³
Giá trị Z , mật độ được tính	4, 1,127 g/cm ³
Kích thước tinh thể	$0,1 \times 0,1 \times 0,1$ mm
Tổng số các phản xạ/số lượng các phản xạ đơn nhất	52006/17198 [$R(\text{cường độ})=0,0876$]
Tính đầy đủ	92,2 %
Xác định pha	Các phương pháp trực tiếp (SHELXT Phiên bản 2014/5)
Phương pháp tinh chế	Phương pháp bình thương nhỏ nhất ma trận đầy đủ trên F^2 (SHELXL Phiên bản 2014/7)
Số liệu/tham số	17198/1116
Mức tốt của chỉ báo phù hợp	1,545
Các số dư: $R(I > 2\sigma(I))$	0,1354
Các số dư: R_w	0,3886
Tham số Flack	0,083(17)
Sự khác biệt đỉnh tối đa và tối thiểu	1,17 và $-0,88$ e ⁻ /Å ³

Ví dụ 2 – Tổng hợp Hợp chất 2

Hợp chất 106 (chất đồng phân *RpRp* của Hợp chất 105) thu được từ Ví dụ 1, Bước E được xử lý riêng rẽ thông qua Ví dụ 1, Bước F và Ví dụ 1, Bước G để thu được Hợp chất 2a (chất đồng phân *RR* của Hợp chất 1a):



Hợp chất 108 (*RpRp*) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,12 (dd, J = 8,2, 0,8 Hz, 2H), 7,99 (s, 2H), 7,96 (s, 2H), 7,65 - 7,48 (m, 10H), 7,38 - 7,33 (m, 2H), 7,26 - 7,24 (m, 4H), 6,22 (d, J = 17,6 Hz, 2H), 5,95 - 5,84 (m, 2H), 5,71 (dd, J = 50,8, 3,9 Hz, 2H) 5,73 - 5,71 (m, 2H), , 4,88 - 4,77 (m, 4H), 4,59 - 4,38 (m, 8H), 4,19 (m, 2H).

Hợp chất 2a (*RpRp*, *trans*) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8,70 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 6,34 (br s, 2H), 5,83 (br s, 2H), 5,73 - 5,53 (m, 2H), 5,38 - 5,01 (m, 2H), 4,76 - 4,32 (m, 6H), 3,95 (br s, 2H), 3,69 - 3,64 (m, 2H); ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ = 55,57 (s, 1P), 55,32 (s, 1P).

Ví dụ 2.1 – Phân tích tia X của Hợp chất 2

Hợp chất 2 (0,5 mg) được cân và được hòa tan trong dung dịch axetonitril/amoniac 28%. Sau đó, dung dịch này được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng với nắp đậy cố định lỏng lẻo. Sau 2 tuần, tinh thể dạng hình que xuất hiện.

Tinh thể đơn hình khối không màu ($0,1 \times 0,1 \times 0,5$ mm) được tìm thấy trong dung dịch kết tinh được phân tán trong Parabar 10312 lỏng và được gắn trên Dual-Thickness MicroMountsTM (MiTeGen). Số liệu khuếch tán được thu thập ở -160°C trên XtaLAB PRO P200 MM007HF (Rigaku) với phương pháp dao động trục ω bằng cách sử dụng bức xạ Cu-K α monocrom hóa phản chiếu đa lớp.

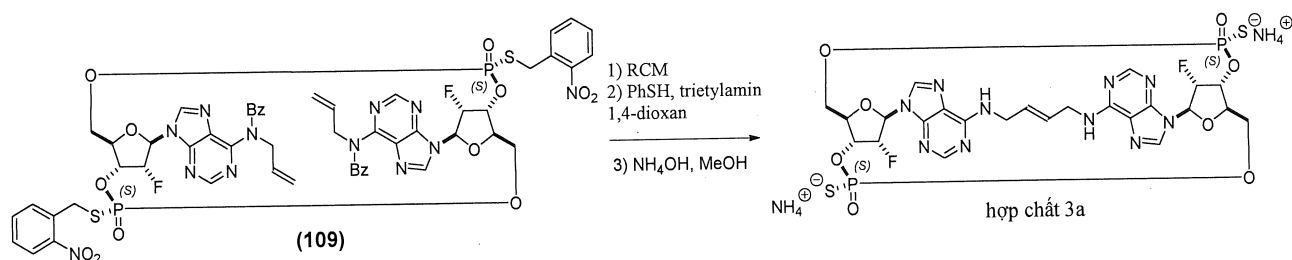
FIG. 4D thể hiện hình ORTEP của phân tử Hợp chất 2.

Các tham số khác của phân tích tia X được thể hiện, dưới đây:

Nhiệt độ	113 K
Bước sóng	1,54187 Å
Hệ tinh thể, Nhóm không gian	Đơn nghiêng, P2
Tham số mạng	a = 14,20210(11) Å
	b = 7,99219(7) Å
	c = 19,03500(14) Å
	$\beta = 94,2005(7)^\circ$
Thể tích	2154,78(3) Å ³
Giá trị Z	2
Kích thước tinh thể	0,1 × 0,1 × 0,5 mm
Tổng số các phản xạ/số lượng các phản xạ đơn nhất	29195/8152 [R(cường độ)=0,0216]
Tính đầy đủ	94,8 %
Sự xác định pha	Các phương pháp trực tiếp (SHELXT Phiên bản 2014/5)
Phương pháp tinh chế	Phương pháp bình thường nhỏ nhất ma trận đầy đủ trên F ² (SHELXL Phiên bản 2014/7)
Số liệu/tham số	8152/518
Mức tốt của chỉ báo phù hợp	1,099
Các số dư: R(I>2σ(I))	0,0711
Các số dư: Rw	0,2133
Tham số Flack	0,020(8)
Sự khác biệt đỉnh tối đa và tối thiểu	1,95 và -0,64 e ⁻ /Å ³

Ví dụ 3 – Tổng hợp Hợp chất 3

Hợp chất 109 (chất đồng phân *SpSp* của Hợp chất 105) thu được từ Ví dụ 1, Bước E được xử lý riêng rẽ thông qua Ví dụ 1, Bước F và Ví dụ 1, Bước G để thu được Hợp chất 3a (chất đồng phân *SS* của Hợp chất 1a):



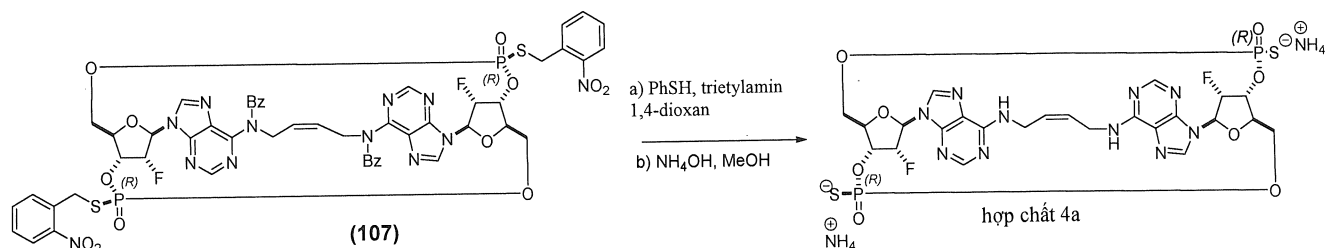
Hợp chất 109 (chất đồng phân *SpSp* của Hợp chất 105): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,52 (s, 2H), 7,99 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,91 (s, 2H), 7,63 - 7,40 (m, 10H), 7,35 - 7,28 (m, 2H), 7,23 - 7,16 (m, 4H), 6,10 - 5,93 (m, 4H), 5,92 - 5,75 (m, 2H), 5,62 - 5,50 (m, 2H), 5,26 - 5,16 (m, 2H), 5,09 - 5,03 (m, 2H), 4,98 - 4,91 (m, 4H), 4,61 - 4,25 (m, 10H)

Hợp chất 3a (*SpSp*, *trans*): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 8,97 (br s, 1H), 8,84 (br s, 1H), 8,21 (br s, 2H), 6,31 (br s, 2H), 6,08 (br d, J = 53,5 Hz, 1H), 5,89 (br s, 2H), 5,63

(br d, $J = 52,4$ Hz, 1H), 5,13 - 4,96 (m, 2H), 4,72 - 4,32 (m, 6H), 4,01 (br d, $J = 9,8$ Hz, 2H), 3,67 (br s, 2H).

Ví dụ 4 -- Tổng hợp Hợp chất 4a

Hợp chất 107 thu được từ Ví dụ 2, Bước F, được phân lập dưới dạng chỉ đồng phân cis qua phép sắc ký silica gel, được xử lý riêng rẽ thông qua Ví dụ 1, Bước G để thu được Hợp chất 4a.

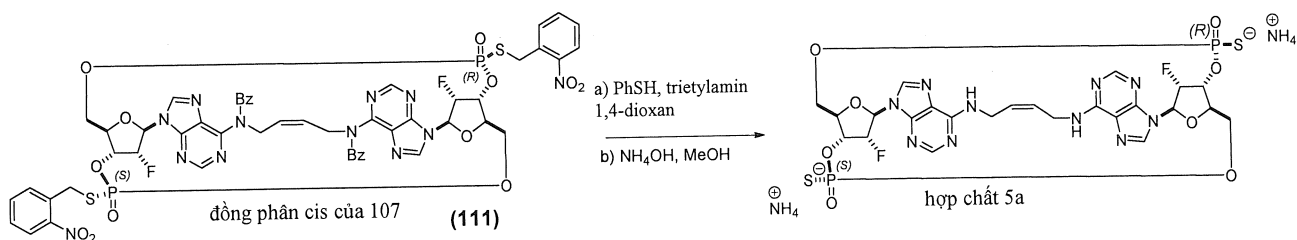


Hợp chất 107: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) $\delta = 8,13$ (s, 2H), 8,12 - 8,08 (m, 2H), 7,91 (s, 2H), 7,65 - 7,55 (m, 4H), 7,54 - 7,45 (m, 6H), 7,33 - 7,27 (m, 2H), 7,23 - 7,16 (m, 4H), 6,14 (d, $J = 17,6$ Hz, 2H), 5,88 (dd, $J = 3,9, 50,8$ Hz, 2H), 5,76 - 5,61 (m, 4H), 5,21 - 4,99 (m, 4H), 4,60 - 4,46 (m, 4H), 4,45 - 4,37 (m, 2H), 4,30 - 4,13 (m, 4H), 3,49 (d, $J = 5,1$ Hz, 2H)

Hợp chất 4a (RpRp, *cis* của 1a, Hợp chất 4a): ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) $\delta = 8,48$ (br s, 2H), 8,02 (br s, 2H), 6,29 (d, $J = 14,8$ Hz, 2H), 5,99 (br s, 2H), 5,43 (d, $J = 51,2$ Hz, 2H), 5,03 - 4,88 (m, 2H), 4,43 (br d, $J = 11,7$ Hz, 2H), 4,32 (br d, $J = 9,4$ Hz, 2H), 4,27 - 4,17 (m, 2H), 4,21 - 4,02 (m, 2H), 3,97 (br dd, $J = 6,1, 12,3$ Hz, 2H).

Ví dụ 5 -- Tổng hợp Hợp chất 5

Đồng phân cis thu được từ Ví dụ 1, Bước F được xử lý riêng rẽ thông qua Ví dụ 1, Bước G để thu được Hợp chất 5a.

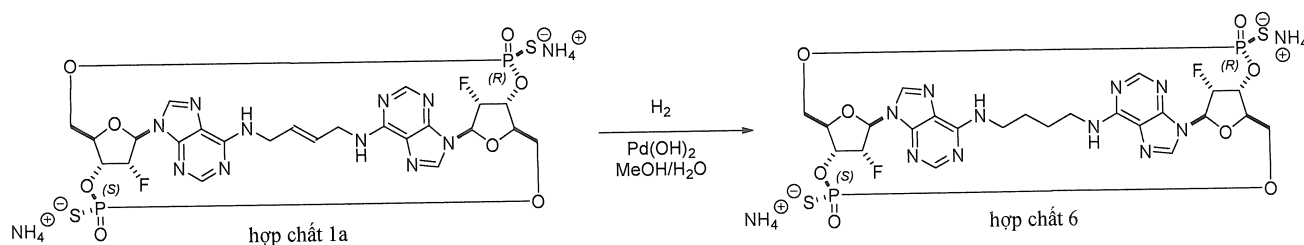


Hợp chất 111 (chất đồng phân cis của Hợp chất 107): ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) $\delta = 8,48$ (s, 1H), 8,15 - 8,09 (m, 1H), 8,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,94

(s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,65 - 7,06 (m, 11H), 6,07 (d, $J = 17,2$ Hz, 1H), 5,98 (d, $J = 20,3$ Hz, 1H), 5,97 - 5,79 (m, 1H), 5,84 (dd, $J = 3,5, 51,2$ Hz, 1H), 5,54 - 5,47 (m, 1H), 5,50 (dd, $J = 3,9, 52,0$ Hz, 1H), 5,38 - 5,21 (m, 2H), 5,18 - 5,02 (m, 2H), 5,02 - 4,95 (m, 1H), 4,78 - 4,69 (m, 1H), 4,60 - 4,16 (m, 10H)

Hợp chất 5a (SpRp, cis của 1a): ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) $\delta = 8,88$ (br s, 1H), 8,51 (br s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 6,38 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 6,33 (d, $J = 14,1$ Hz, 1H), 6,14 - 6,09 (m, 2H), 6,01 (d, $J = 49,2$ Hz, 1H), 5,42 (d, $J = 49,6$ Hz, 1H), 5,02 - 4,87 (m, 2H), 4,76 - 3,92 (m, 8H), 3,75 - 3,56 (m, 2H)

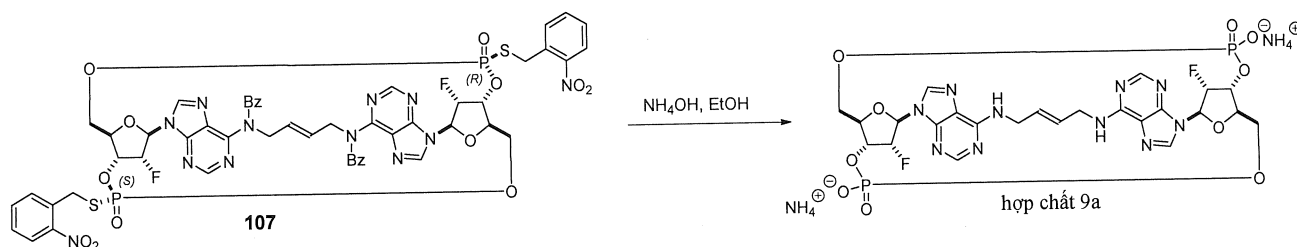
Ví dụ 6 -- Tổng hợp Hợp chất 6a (SpRp)



Bổ sung paladi hydroxit trên cacbon (20% khối lượng nền khô, 2 mg) vào dung dịch chứa Hợp chất 1a (1,5 mg, 2,0 μmol) trong MeOH/H₂O(0,6/0,5 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp tạo thành được xử lý bằng hydro (bình cầu) trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi dùng hết nguyên liệu ban đầu, hỗn hợp này được lọc và được rửa bằng metanol tới khi tất cả các sản phẩm được làm trong ra. Chất lọc được cô trong chân không và cần được hòa tan trong nước (1 ml). Tinh chế RHPLC tạo ra Hợp chất 6a (0,9 mg).

LCMS (MS m/z 749,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Ví dụ 7 -- Tổng hợp Hợp chất 9



Bổ sung amoni hydroxit (1 mL) vào dung dịch chứa 107 (3,7 mg, 3,02 μmol) trong EtOH (1,5 mL). Hỗn hợp tạo thành được gia nhiệt tại 50°C trong 8 giờ và được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện

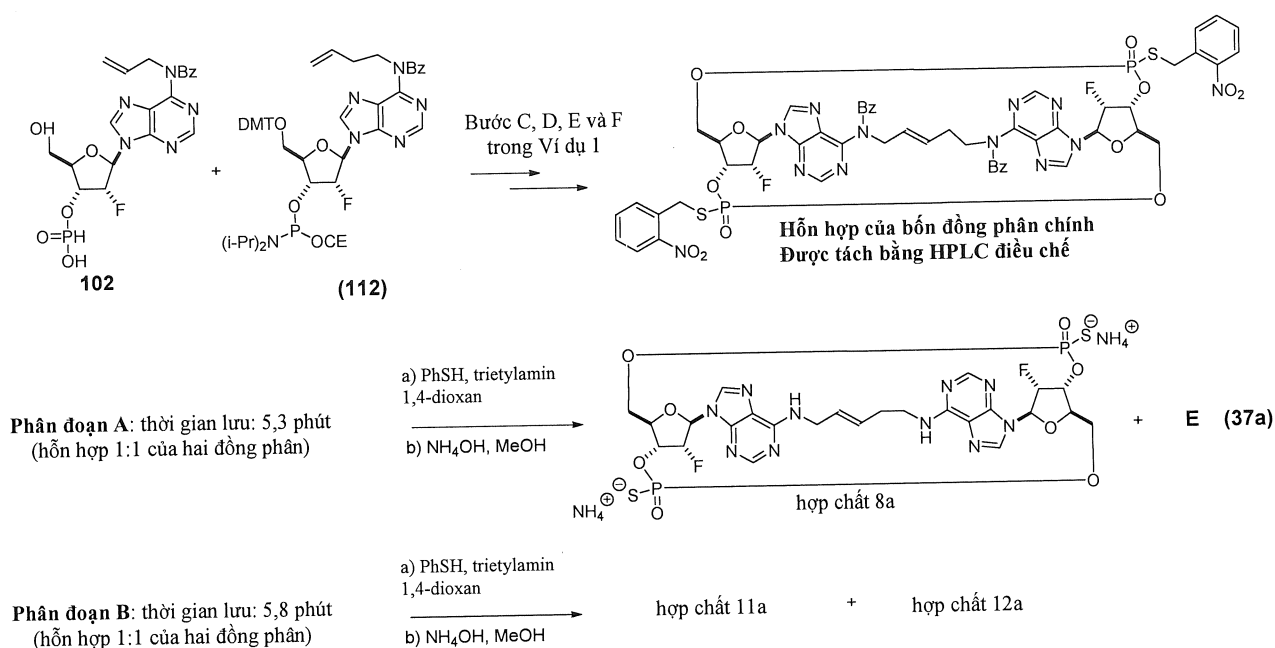
áp suất giảm. Phần cặn được xử lý bằng 2 mL nước và chất rắn tạo thành được lọc ra. Chất lọc này được đưa vào HPLC điều chế để thu được hợp chất 9a (2,5 mg).

Hợp chất 9a: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,67 (br s, 1H), 8,50 (br s, 1H), 8,25 (br s, 1H), 8,12 (br s, 1H), 6,47 - 6,28 (m, 2H), 5,92 - 5,79 (m, 2H), 5,74 (d, J = 50,8 Hz, 1H), 5,32 (d, J = 52,4 Hz, 1H), 5,16 - 4,95 (m, 2H), 4,71 - 4,25 (m, 6H), 4,17 - 3,97 (m, 2H), 3,83 - 3,61 (m, 2H).

LCMS: MS m/z 715,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ví dụ 8 - Con đường tổng hợp các hợp chất 8a, 11a và 12a

Với Hợp chất 112 và hợp chất 102 làm nguyên liệu ban đầu, các hợp chất 8, 11 và 12 được điều chế thông qua các trình tự phản ứng giống như các trình tự được mô tả trong Ví dụ 1.



Các điều kiện HPLC điều chế cho các phân đoạn A và B

Trang thiết bị		Agilent 1200				
Cột HPLC		Cột Sunfire Prep C18 OBD nước, 5 μm , 19 x 100 mm, #186002567				
Tốc độ dòng		20 phút				
Pha động		A: nước, B: axetonitril				
Gradient	Thời điểm (phút)	0	8	9,9	10	11
	B%	40	99	99	40	40
Thời gian chạy		12 phút				
Thể tích tiêm		250 μl (0,03 g/ml trong axetonitril)				
Phát hiện		UV 254 nm				
Thời gian lưu	Phân đoạn A	5,3 phút				
	Phân đoạn B	5,8 phút				

Hợp chất 8a: Phân đoạn A được xử lý qua Bước G, Ví dụ 1 để thu được hai chất đồng phân mà được phân tách bằng phương pháp HPLC. Hợp chất 8a là chất đồng phân chạy nhanh hơn (thời gian lưu: 4,1 phút) và Hợp chất 37a (thời gian lưu: 4,5 phút) là chất đồng phân chạy chậm hơn.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,01 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 6,34 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 6,31 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 5,92 (dd, J = 2,7, 51,2 Hz, 1H), 5,85 - 5,71 (m, 2H), 5,37 (d, J = 51,6 Hz, 1H), 4,81 - 4,56 (m, 6H), 4,52 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,42 (br d, J = 9,4 Hz, 3H), 4,05 (dd, J = 4,1, 11,9 Hz, 1H), 3,95 (br dd, J = 4,3, 12,1 Hz, 1H), 3,94 - 3,84 (m, 1H), 3,62 (br dd, J = 4,9, 15,4 Hz, 1H), 2,71 - 2,58 (m, 1H), 2,46 - 2,33 (m, 1H)

^{31}P NMR (162 MHz, METANOL- d_4) δ = 55,36 (s, 1P), 55,18 (s, 1P)

LCMS: MS m/z 761,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Hợp chất 37a: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,95 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,15 (br s, 1H), 6,34 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 6,31 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,96 - 5,68 (m, 3H), 5,40 (dd, J = 2,7, 51,6 Hz, 1H), 4,85 (s, 3H), 4,58 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,49 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,43 - 4,33 (m, 3H), 4,29 (dd, J = 8,6, 14,1 Hz, 1H), 4,05 (dd, J = 4,5, 11,9 Hz, 1H), 3,95 (dd, J = 4,9, 12,3 Hz, 1H), 3,94 - 3,86 (m, 1H), 2,67 - 2,55 (m, 1H), 2,52 - 2,40 (m, 1H).

Hợp chất 8a/37a: Các điều kiện HPLC điều chế

Trang thiết bị		Agilent 1200/1260 AS/FC
Cột HPLC		XBridge C18 nước, 10 x 100 mm, # 1413
Tốc độ dòng		4,0 ml/phút
Nhiệt độ cột		35°C
Pha động		A: 0,1% NH_4OH trong nước, B: 0,1% NH_4OH trong axetonitril
Gradient (B%)		0 $\rightarrow$ 50
Thời gian chạy		20 phút
Thể tích tiêm		50 μl (4 mg/ml trong nước)
Phát hiện		UV 260 nm
Thời gian lưu	Hợp chất 8a	4,1 phút
	Hợp chất 37a	4,5 phút

Phân đoạn B được xử lý qua Bước G, Ví dụ 1 để thu được hai chất đồng phân mà được phân tách bằng phương pháp HPLC điều chế được mô tả dưới đây. Hợp chất 11a là chất đồng phân chạy nhanh hơn (thời gian lưu: 11,2 phút) và hợp chất 12a là chất đồng phân chạy chậm hơn (thời gian lưu: 12,1 phút)

Hợp chất 11a: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,63 (br s, 2H), 8,18 (br s, 1H), 8,17 (br s, 1H), 6,34 (d, J = 13,3 Hz, 1H), 6,32 (d, J = 12,9 Hz, 1H), 5,86 - 5,65 (m, 2H), 5,48 (d, J = 48,5 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 43,8 Hz, 1H), 4,84 - 4,53 (m, 6H), 4,47 - 4,36 (m, 2H), 4,05 - 3,91 (m, 2H), 3,96 - 3,85 (m, 1H), 3,70 - 3,54 (m, 1H), 2,66 - 2,54 (m, 1H), 2,43 - 2,30 (m, 1H)

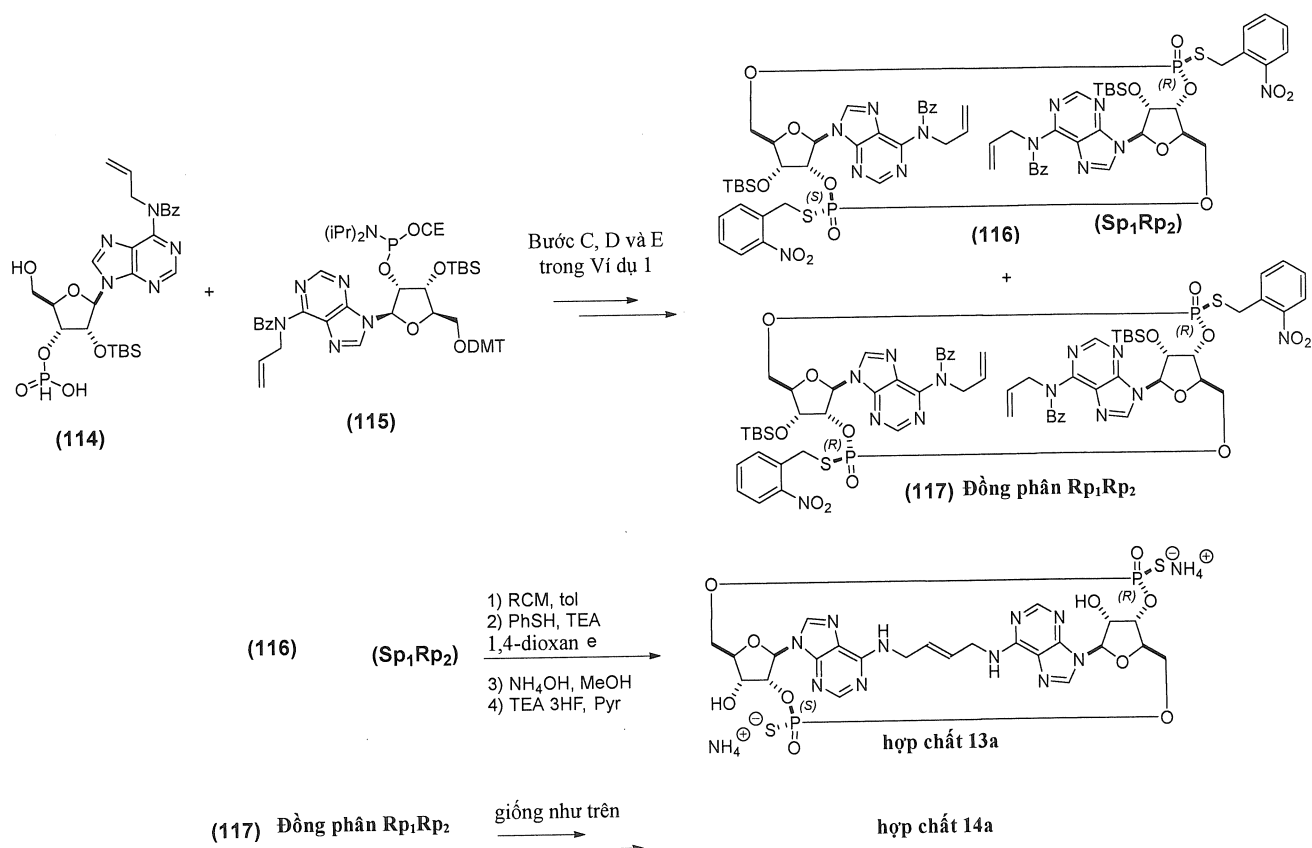
Hợp chất 12a: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,56 (br s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,95 (br s, 1H), 6,35 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 6,31 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 5,82 - 5,65 (m, 2H), 5,50 (d, J = 51,2 Hz, 1H), 5,36 (d, J = 53,9 Hz, 1H), 4,74 - 4,33 (m, 8H), 4,26 - 4,16 (m, 1H), 4,07 - 3,93 (m, 3H), 2,64 - 2,44 (m, 2H).

Hợp chất 11a/12a: Các điều kiện HPLC điều chế

Trang thiết bị		Agilent 1200/1260 AS/FC
Cột HPLC		Xterra C18 nước, 10 x 100mm # 3128
Tốc độ dòng		3,0 ml/phút
Nhiệt độ cột		35°C
Pha động		A: Axit formic 0,1% trong nước, B: Axit formic 0,1% trong axetonitril
Gradient (B%)		0 $\rightarrow$ 30
Thời gian chạy		20 phút
Thể tích tiêm		50 μl (2,5 mg/ml trong nước)
Phát hiện		UV 260 nm
Thời gian lưu	Hợp chất 11a	11,2 phút
	Hợp chất 12a	12,1 phút

Ví dụ 9 - Con đường tổng hợp hợp chất 13 và 14

Với Hợp chất 114 và Hợp chất 115 làm các nguyên liệu ban đầu, Hợp chất 13 và 14 được điều chế thông qua các trình tự phản ứng giống như các trình tự được mô tả trong Ví dụ 1 cộng bước khử bảo vệ TBS.



Hợp chất 116: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 9,36 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,76 (s, 2H), 8,07 (br dd, J = 1,8, 7,6 Hz, 3H), 8,05 - 8,00 (m, 2H), 7,99 (s, 1H), 7,87 - 7,82 (m, 1H), 7,70 - 7,65 (m, 1H), 7,63 - 7,55 (m, 3H), 7,55 - 7,41 (m, 6H), 7,39 - 7,35 (m, 1H), 7,30 - 7,26 (m, 1H), 6,37 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 5,89 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 5,36 - 5,27 (m, 2H), 5,15 (ddd, J = 3,7, 8,4, 11,7 Hz, 1H), 4,64 - 4,43 (m, 4H), 4,43 - 4,38 (m, 1H), 4,37 - 4,30 (m, 1H), 4,23 - 4,13 (m, 2H), 4,11 - 3,98 (m, 2H), 3,97 - 3,86 (m, 1H), 0,97 (s, 9H), 0,83 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H), 0,16 (s, 3H), -0,13 (s, 3H).

Hợp chất 13a: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,78 (br s, 1H), 8,47 (br s, 1H), 8,21 (br s, 1H), 8,08 (br s, 1H), 6,44 - 6,21 (m, 1H), 6,19 - 6,03 (m, 1H), 6,01 - 5,78 (m, 2H), 5,38 - 4,95 (m, 2H), 4,67 - 4,45 (m, 5H), 4,45 - 4,35 (m, 1H), 4,34 - 4,29 (m, 1H), 4,25 (br d, J = 11,3 Hz, 1H), 4,18 - 3,89 (m, 2H), 3,88 - 3,54 (m, 2H).

^{31}P NMR (162 MHz, METANOL- d_4) δ = 56,89 (br s, 1P), 56,37 (br s, 1P)

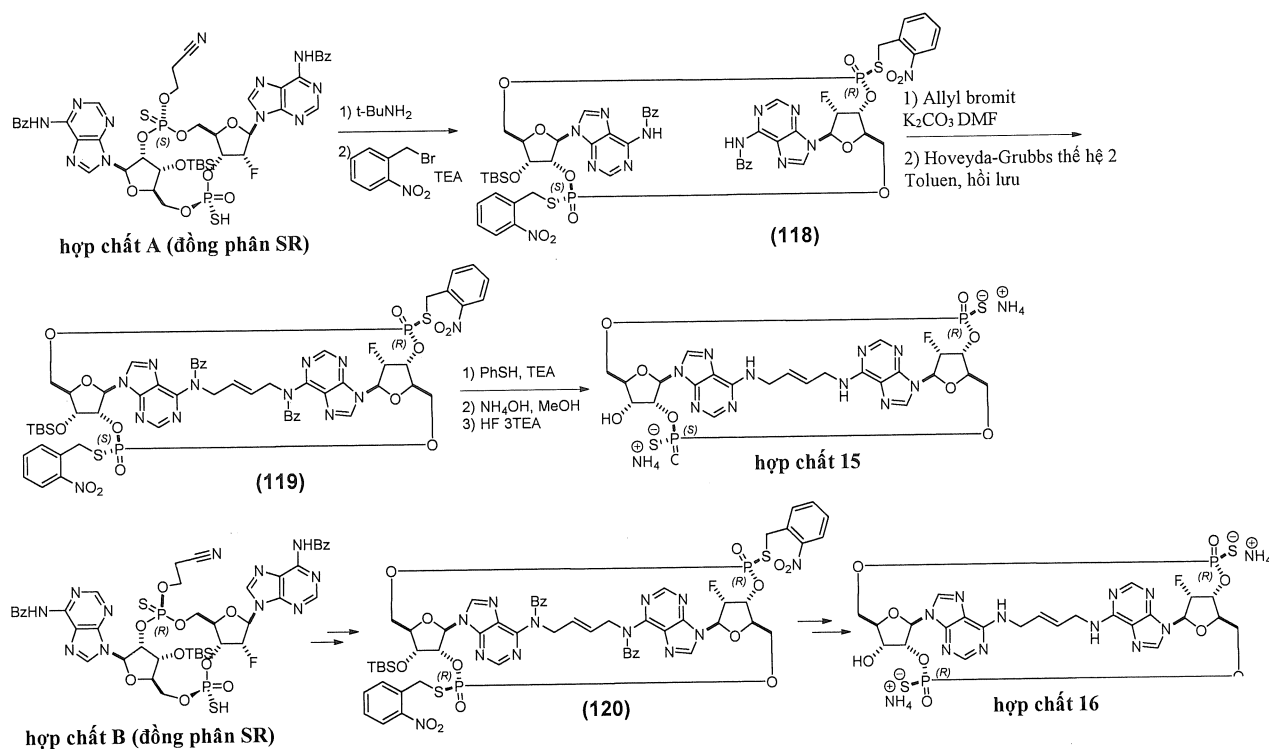
Hợp chất 117 (chất đồng phân Rp_1Rp_2 của Hợp chất 116): ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 9,36 (br s, 1H), 9,11 (br s, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,14 - 7,96 (m, 6H), 7,72 - 7,27 (m, 13H), 6,44 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 5,84 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,59 - 5,50 (m, 1H), 5,48 - 5,44 (m, 1H), 5,33 - 5,24 (m, 1H), 4,75 - 3,85

(m, 11H), 0,90 (s, 9H), 0,79 (s, 9H), 0,20 (s, 3H), 0,11 (s, 3H), 0,07 (s, 3H), -0,21 (s, 3H)

Hợp chất 14a (chất đồng phân RpRp₂ của hợp chất 13a)

LCMS: MS m/z 743,17 [M+H]⁺

Ví dụ 10 - Con đường tổng hợp hợp chất 15 và 16



Bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất A (2,63 g, 2,46 mmol) trong MeCN (26,3 ml) tert-butylamin (13,15 ml, 124,1 mmol). Sau khi được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường xung quanh, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng MeCN. Phần cặn được hòa tan trong MeCN (52,6 ml) và được xử lý bằng 1-(bromometyl)-2-nitrobenzen (1,064 g, 4,925 mmol) và triethylamin (0,755 ml, 5,42 mmol). Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS), hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (etyl axetat/n-heptan 66% đến etyl axetat 100%) để thu được 0,226 g Hợp chất 118. Sản phẩm được phân lập được hòa tan trong DMF (5 mL) và allyl bromua (0,046 ml, 0,528 mmol) và kali cacbonat (0,073 g, 0,528 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi quá trình này được theo dõi bằng LCMS. Sau 19 giờ, hỗn hợp 1/1 của MTBE/EtOAc (12/12 mL), dung dịch Dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (15 ml), và nước (10 mL) được bổ sung. Lốp hữu cơ được tách ra, được rửa bằng nước muối (5 mL) hai lần, được làm khô trên MgSO_4 và được cô trong chân không.

Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (etyl axetat/n-heptan 50% đến etyl axetat 100%) để thu được 37 mg sản phẩm đã được bis-allyl hóa. Sản phẩm được phân lập này (37 mg, 0,027 mmol) được hòa tan trong toluen (55 mL) và được đun hồi lưu nhẹ (bể dầu 120-125°C). Dung dịch chứa chất xúc tác Hoveyda-Grubbs thế hệ thứ hai ((1,3-Bis-(2,4,6-trimetylphenyl)-2-imidazolidinyliden)dicloro(o-isopropoxyphenylmetylen) ruteni; sẵn có tại danh mục SIGMA-ALDRITCH® số 569755; CAS 301224-40-8; 8,5 mg, 0,014 mmol) và quinon (5,9 mg, 0,054 mmol) trong toluen (10 mL) được bổ sung. Hỗn hợp này được đun hồi lưu và quy trình phản ứng được theo dõi bằng LC/MS. Sau khi dùng hết nguyên liệu ban đầu, hỗn hợp này được làm mát xuống đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được xử lý bằng DMSO (0,059 ml, 0,81 mmol) trong 15 giờ. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO₂ 10g, etyl axetat 66% trong n-heptan đến 100 % etyl axetat) để thu được Hợp chất 119 (2,2 mg).

Hợp chất 119: ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,49 (s, 1H), 8,12 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,05 - 8,02 (m, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,70 - 7,10 (m, 17H), 6,27 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,15 - 6,05 (m, 1H), 5,97 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,94 - 5,72 (m, 3H), 4,94 (br s, 2H), 4,86 - 4,69 (m, 2H), 4,67 - 4,60 (m, 1H), 4,60 - 4,44 (m, 4H), 4,39 - 4,33 (m, 1H), 4,31 - 4,10 (m, 6H), 0,96 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,19 (s, 3H)

Hợp chất 119 được xử lý qua Bước G trong Ví dụ 1, tiếp theo là khử bảo vệ TBS bằng TEA 3HF để thu được hợp chất 15a.

Hợp chất 15a: ¹H NMR (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,76 (br s, 1H), 8,44 (br s, 1H), 8,24 (br s, 1H), 8,07 (br s, 1H), 6,45 - 6,19 (m, 2H), 6,12 - 5,75 (m, 2H), 5,54 (br d, J = 51,6 Hz, 1H), 5,67 - 5,06 (m, 2H), 4,66 - 4,37 (m, 3H), 4,47 - 4,37 (m, 1H), 4,36 - 4,22 (m, 2H), 4,17 - 3,94 (m, 2H), 3,94 - 3,80 (m, 1H) 3,80 - 3,59 (m, 2H)

Hợp chất 16 thu được từ hợp chất B (chất đồng phân RR của hợp chất A) qua cùng các trình tự như được mô tả trong hợp chất 15.

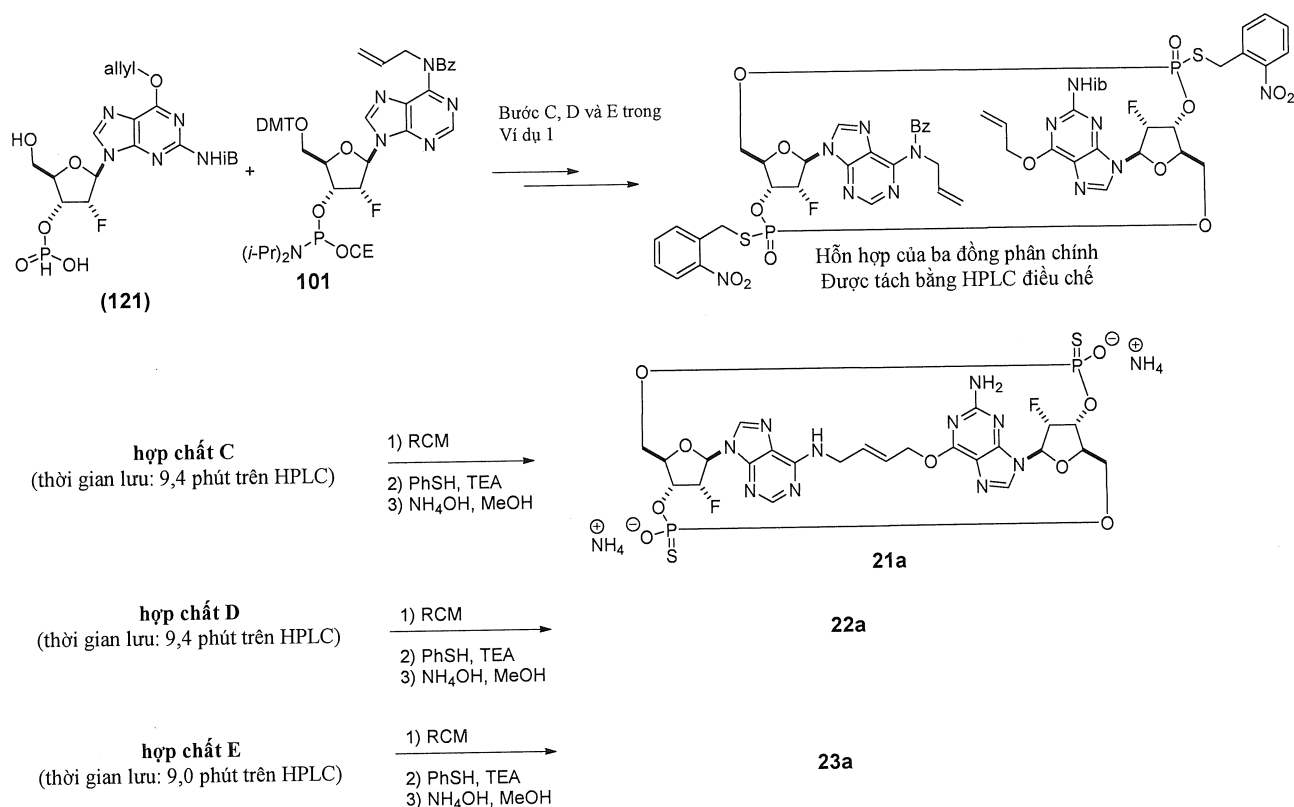
Hợp chất 120 (chất đồng phân Rp₁Rp₂ của Hợp chất 119): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,89 (s, 1H), 8,10 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,01 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,85 - 7,74 (m, 4H), 7,69 - 7,61 (m, 2H), 7,58 (s, 1H), 7,55 - 7,48 (m, 1H), 7,45 - 7,30 (m, 6H), 7,22 - 7,15 (m, 1H), 7,13 - 7,04 (m, 3H), 6,76 - 6,68 (m, 1H), 6,31 - 6,22 (m, 1H), 6,22 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 6,12 - 5,99 (m, 2H), 5,94 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,92 - 5,81

(m, 1H), 5,67 (dd, $J = 3,5, 51,2$ Hz, 1H), 5,08 - 4,93 (m, 2H), 4,87 - 4,77 (m, 1H), 4,60 - 4,22 (m, 8H), 4,21 - 4,16 (m, 1H), 4,11 - 4,02 (m, 1H), 3,94 (br d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 3,66 (dd, $J = 4,7, 11,3$ Hz, 1H), 0,90 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H)

Hợp chất 16a: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) $\delta = 8,54$ (br s, 1H), 8,24 (br s, 1H), 8,17 (br s, 1H), 8,08 (br s, 1H), 6,44 - 6,23 (m, 2H), 6,07 - 5,68 (m, 2H), 5,43 (d, $J = 50,4$ Hz, 1H), 5,31 - 5,05 (m, 2H), 4,69 - 4,26 (m, 6H), 4,19 - 3,90 (m, 2H), 3,90 - 3,57 (m, 3H)

Ví dụ 11 -- Con đường tổng hợp các chất tương tự Hợp chất Adenin/Guanin (A/G) -- Hợp chất 21, Hợp chất 22, và Hợp chất 23

Với Hợp chất 121 và Hợp chất 101 làm nguyên liệu ban đầu, các chất tương tự adenin/guanin được điều chế thông qua các trình tự phản ứng giống như các trình tự được mô tả trong Ví dụ 1.



Các điều kiện HPLC điều chế để phân tách các hợp chất C, D và E

Trang thiết bị	Agilent 1100
Cột HPLC	Cột Sunfire Prep C18 OBD nước, 5 um, 19 x 100 mm, #186002567
Tốc độ dòng	12 phút

Pha động		A: nước, B: axetonitril				
Gradient	Thời điểm (phút)	0	13	14,5	14,51	16
	B%	40	99	99	40	40
Thời gian chạy		16 phút				
Thể tích tiêm		150 μ l (0,027 g/ml trong axetonitril)				
Phát hiện		UV 254 nm				
Thời gian lưu	Hợp chất C	9,9 phút				
	Hợp chất D	9,4 phút				
	Hợp chất E	9,0 phút				

Hợp chất D: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,60 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,04 - 8,01 (m, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,99 - 7,95 (m, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,63 - 7,51 (m, 5H), 7,46 - 7,41 (m, 1H), 7,39 - 7,30 (m, 3H), 7,25 - 7,20 (m, 2H), 6,96 - 6,84 (m, 1H), 6,19 - 5,99 (m, 4H), 5,67 (dd, J = 4,3, 52,3 Hz, 1H), 5,47 (dd, J = 1,4, 17,4 Hz, 1H), 5,36 - 5,24 (m, 4H), 5,14 - 5,09 (m, 1H), 5,08 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 5,04 - 4,98 (m, 2H), 4,51 - 4,30 (m, 10H), 4,21 - 4,13 (m, 1H), 2,83 - 2,67 (m, 1H), 1,16 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,14 (d, J = 6,6 Hz, 3H)

Hợp chất D được xử lý qua các Bước F và G, Ví dụ 1 để thu được Hợp chất 22.

Hợp chất 22: LCMS: MS m/z 763,07 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Hợp chất C: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 9,08 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,07 - 8,02 (m, 2H), 8,02 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,55 - 7,30 (m, 9H), 7,24 - 7,19 (m, 2H), 6,58 - 6,45 (m, 1H), 6,23 - 5,97 (m, 4H), 5,97 - 5,86 (m, 1H), 5,63 - 5,57 (m, 1H), 5,54 - 5,47 (m, 1H), 5,48 - 5,44 (m, 1H), 5,35 - 5,30 (m, 1H), 5,29 - 5,22 (m, 1H), 5,18 - 5,13 (m, 2H), 5,11 - 5,07 (m, 1H), 5,02 - 4,97 (m, 2H), 4,51 - 4,22 (m, 9H), 4,14 - 4,07 (m, 1H), 2,99 - 2,85 (m, 1H), 1,20 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 1,17 (d, J = 7,0 Hz, 3H)

Hợp chất C được xử lý qua các Bước F và G trong Ví dụ 1 để thu được Hợp chất 21

Hợp chất 21: LCMS: MS m/z 763,13 $[\text{M}+\text{H}]^+$

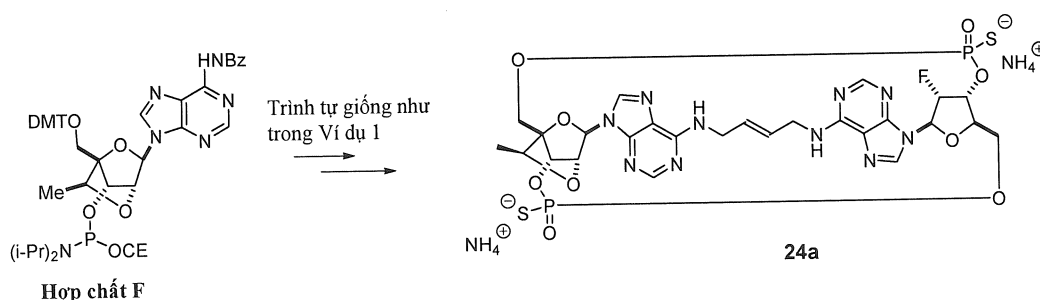
Hợp chất E: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,99 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,02 - 7,94 (m, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,68 - 7,63 (m, 1H), 7,60 - 7,55 (m, 1H), 7,54 - 7,49 (m, 2H), 7,45 - 7,31 (m, 5H), 7,25 - 7,21 (m, 2H), 6,22 - 5,94 (m, 6H), 5,56 (br dd, J = 5,1, 51,5 Hz, 1H), 5,54 - 5,46 (m, 1H), 5,34 - 5,29 (m, 1H), 5,29 - 5,22 (m, 2H), 5,16 - 5,08 (m, 3H), 5,02 - 4,96 (m, 2H), 4,62 - 4,54 (m, 1H), 4,52 - 4,26 (m, 9H), 2,93 - 2,81 (m, 1H), 1,21 (d, J = 2,3 Hz, 3H), 1,20 (d, J = 2,0 Hz, 3H)

Hợp chất E được xử lý qua các Bước F và G trong Ví dụ 1 để thu được Hợp chất 23

Hợp chất 23: LCMS: MS m/z 763,18 $[M+H]^+$

Ví dụ 12 -- Tổng hợp Hợp chất 24

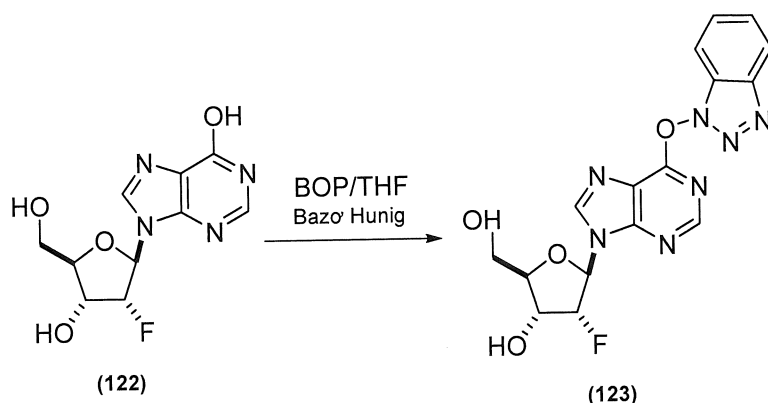
Với hợp chất F, Hợp chất 24a được điều chế thông qua các trình tự phản ứng giống như các trình tự được mô tả trong Ví dụ 1.



Hợp chất 24: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,95 (br s, 1H), 8,29 (br s, 1H), 8,23 (br s, 1H), 8,08 (br s, 1H), 6,31 (br d, J = 12,9 Hz, 2H), 6,23 - 6,07 (m, 1H), 6,04 - 5,84 (m, 2H), 5,71 (br d, J = 50,8 Hz, 1H), 5,27 - 4,32 (m, 7H), 4,27 - 4,16 (m, 1H), 4,12 (dd, J = 5,7, 11,9 Hz, 1H), 4,07 - 3,98 (m, 1H), 3,78 - 3,62 (m, 2H), 1,40 (d, J = 7,0 Hz, 3H)

Ví dụ 13 – Tổng hợp Hợp chất 18, Hợp chất 19, và Hợp chất 20

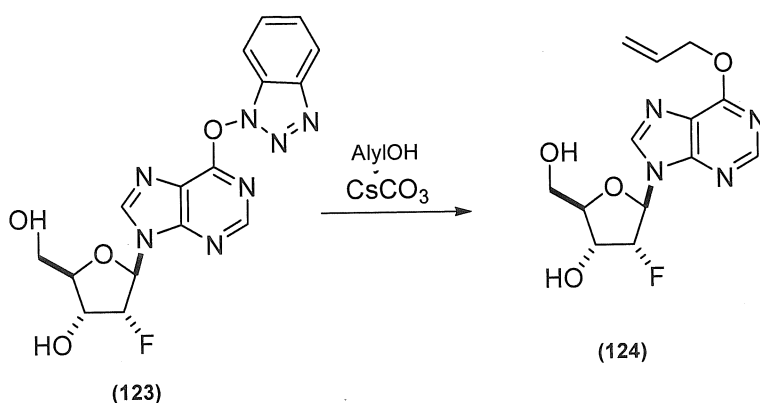
Con đường tổng hợp này được thể hiện trên FIG. 3.



Bổ sung BOP (327 mg, 0,74 mmol) vào dung dịch chứa 9-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-ol (100 mg, 0,37 mmol) và bazơ Hunig (0,129 ml, 0,74 mmol) trong DMF (1 ml) ở 20°C. Hỗn hợp này được khuấy ở 20°C qua đêm. UPLC-MS chỉ ra rằng phản ứng đã hoàn thành. Dung môi được loại bỏ trên máy cô quay chân không cao. Phần cặn được hòa tan trong DCM và

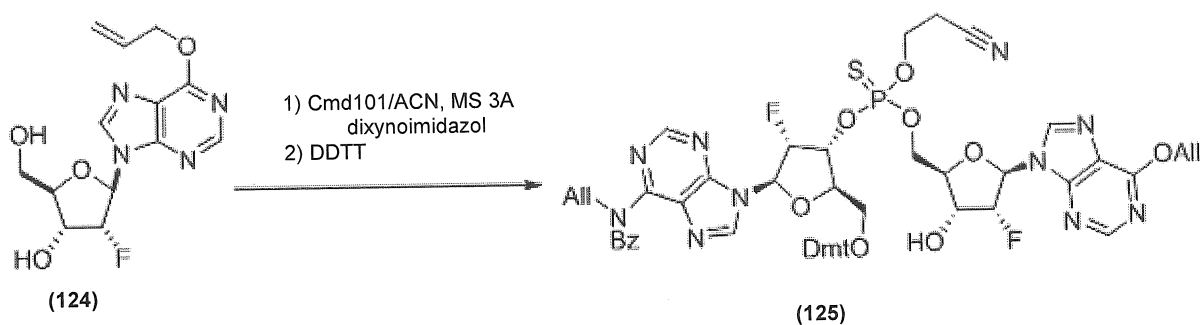
được tinh chế bằng cách sử dụng Biotage (cột 24 g Si-gel, EtOAc trong Heptan= 0 đến 100%, 10 thể tích, 100%, 10 thể tích) để thu được 105 mg của sản phẩm cộng BOP với hiệu suất 73%.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 3,74 - 3,84 (m, 1 H) 3,92 - 4,00 (m, 1 H) 4,12 - 4,19 (m, 1 H) 4,62 - 4,74 (m, 1 H) 5,37 - 5,57 (m, 1 H) 6,41 - 6,52 (m, 1 H) 7,47 - 7,55 (m, 1 H) 7,57 - 7,64 (m, 2 H) 8,03 - 8,14 (m, 1 H) 8,36 - 8,46 (m, 1 H) 8,86 (s, 1 H)



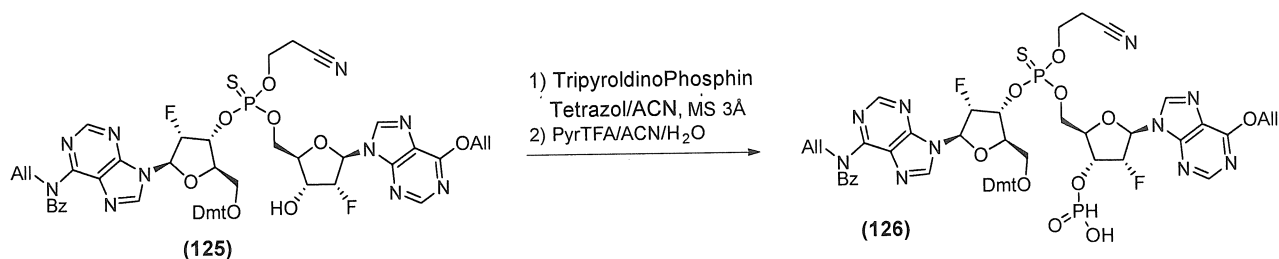
Bổ sung xesi cacbonat (500 mg, 1,535 mmol) vào dung dịch chứa (2R,3R,4R,5R)-5-(6-((1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9H-purin-9-yl)-4-floro-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol (135 mg, 0,349 mmol) trong rượu allylic (3 ml) ở 20°C. Hỗn hợp được khuấy ở 20°C trong 1 giờ. UPLC-MS chỉ ra rằng phản ứng đã hoàn thành. Phản ứng này được thực hiện với NaHCO_3 /nước muối bão hòa và được chiết bằng EtOAc/Hept. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 và được lọc. Dung môi và các chất hữu cơ dễ bay hơi trong chất lọc được loại bỏ trên máy cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng Biotage (cột 12 g Si-gel, EtOAc trong Heptan=0 đến 100 %, 10 thể tích, 100%, 10 thể tích) để thu được 100 mg sản phẩm cộng allyl mong muốn với hiệu suất 92%.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ ppm 8,56 (s, 1 H) 8,47 (s, 1 H) 6,29 - 6,41 (m, 1 H) 6,06 - 6,21 (m, 1 H) 5,33 - 5,53 (m, 2 H) 5,22 - 5,31 (m, 1 H) 5,02 - 5,14 (m, 2 H) 4,56 - 4,71 (m, 1 H) 4,10 - 4,18 (m, 1 H) 3,88 - 3,96 (m, 1 H) 3,70 - 3,79 (m, 1 H)

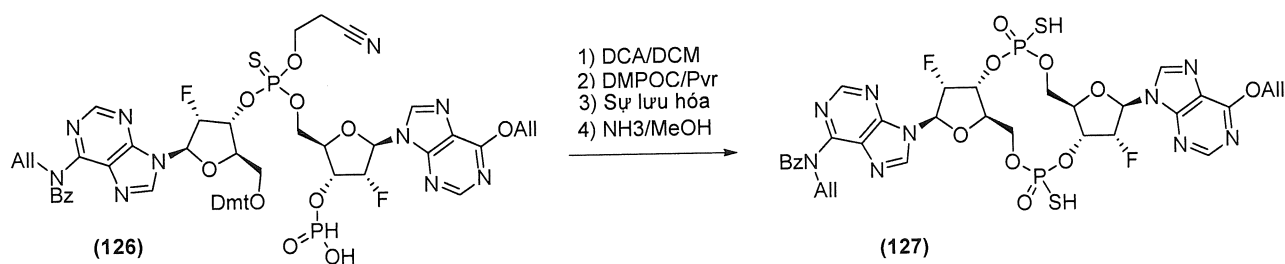


Bổ sung các rây phân tử (3 A, 150 mg) vào dung dịch chứa diisopropylphosphoramidit (150 mg, 0,164 mmol) và (2R,3R,4R,5R)-5-(6-(allyloxy)-9H-purin-9-yl)-4-floro-2-(hydroxymetyl)tetrahydrofuran-3-ol (76 mg, 0,246 mmol) trong axetonitril (1069 μ l, 20,47 mmol) ở 20°C. Hỗn hợp được khuấy ở 20°C trong 1 giờ trước khi 1H-imidazol-4,5-dicacbonitril (38,7 mg, 0,328 mmol) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. UPLC-MS chỉ ra rằng phản ứng đã hoàn thành. (E)-N,N-dimetyl-N'-(3-thioxo-3H-1,2,4-dithiazol-5-yl)formimidamit (37,0 mg, 0,18 mmol) được bổ sung. UPLC-MS chỉ ra rằng sự lưu hóa được hoàn thành trong 30 phút. Phản ứng được thực hiện với NaHCO_3 /nước muối bão hòa và được chiết bằng EtOAc/Hept. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 và được lọc. Dung môi và các chất hữu cơ dễ bay hơi trong chất lọc được loại bỏ trên máy cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng Biotage (cột 25 g Si-gel, EtOAc trong Heptan=0 đến 100%, 15 thể tích, 100%, 10 thể tích).

^1H NMR (500 MHz, METANOL- d_4 , hai chất đồng phân không đối quang ~1:1) δ ppm 8,62 - 8,63 (m, 1 H) 8,57 - 8,58 (m, 1 H) 8,48 - 8,50 (m, 1 H) 8,44 - 8,46 (m, 1 H) 8,40 - 8,41 (m, 1 H) 8,38 - 8,39 (m, 1 H) 8,33 - 8,35 (m, 1 H) 8,25 - 8,27 (m, 1 H) 7,22 - 7,33 (m, 11 H) 7,11 - 7,20 (m, 17 H) 7,05 - 7,11 (m, 4 H) 6,83 - 6,92 (m, 6 H) 6,65 - 6,77 (m, 11 H) 6,28 - 6,41 (m, 5 H) 6,23 - 6,28 (m, 2 H) 6,10 - 6,22 (m, 5 H) 6,00 - 6,10 (m, 4 H) 5,89 - 6,00 (m, 5 H) 5,52 - 5,57 (m, 2 H) 5,45 - 5,52 (m, 3 H) 5,41 - 5,45 (m, 1 H) 5,24 - 5,34 (m, 4 H) 5,13 - 5,17 (m, 3 H) 5,07 - 5,12 (m, 5 H) 4,93 - 4,98 (m, 4 H) 4,88 - 4,93 (m, 5 H) 4,73 - 4,82 (m, 3 H) 4,50 - 4,59 (m, 2 H) 4,36 - 4,48 (m, 4 H) 4,27 - 4,36 (m, 5 H) 4,16 - 4,27 (m, 5 H) 3,83 - 4,04 (m, 5 H) 3,73 - 3,78 (m, 13 H) 3,64 - 3,73 (m, 4 H) 3,52 - 3,58 (m, 1 H) 3,45 - 3,51 (m, 2 H) 3,35 - 3,41 (m, 2 H) 3,16 - 3,23 (m, 2 H) 3,08 - 3,15 (m, 2 H) 2,84 - 2,93 (m, 2 H) 2,79 - 2,83 (m, 2 H) 2,70 - 2,77 (m, 2 H) 2,61 - 2,69 (m, 3 H)



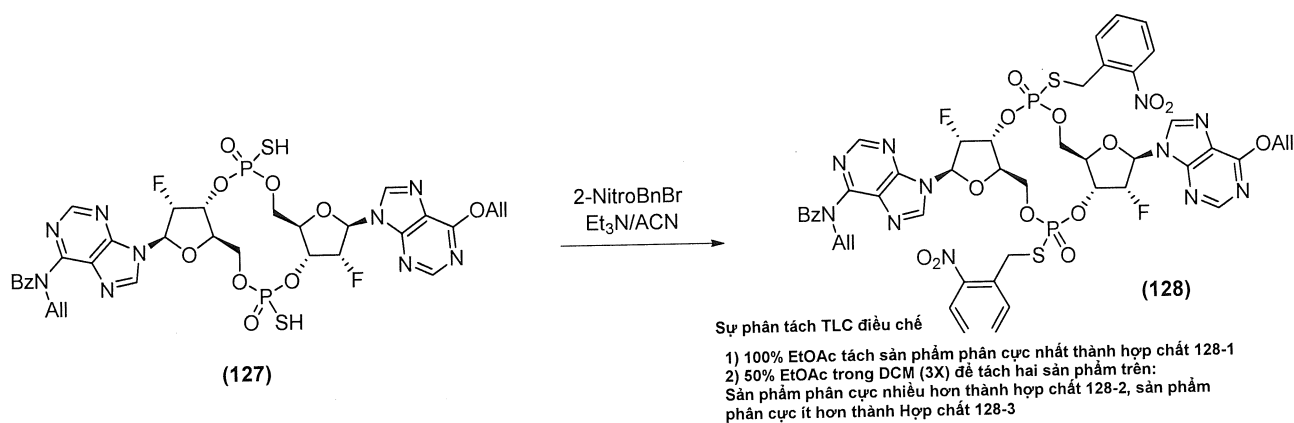
Bổ sung các rây phân tử vào dung dịch chứa O-((2R,3R,4R,5R)-5-(6-(N-allylbenzamido)-9H-purin-9-yl)-2-((bis(4-metoxypheyl)(phenyl)metoxy)metyl)-4-florotetrahydrofuran-3-yl) O-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-(alyloxy)-9H-purin-9-yl)-4-floro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)metyl) O-(2-xyanoetyl) phosphorothioat (120 mg, 0,104 mmol) trong axetonitril (4171 μ l, 79,852 mmol) (3A, 1 khối lượng) ở 20°C. Hỗn hợp này được khuấy ở 20°C trong 1 giờ trước khi tripyrrolidinophosphin (71,6 μ l, 0,311 mmol) được bổ sung. Sau đó tetrazol 0,45 M trong ACN (253 μ l, 0,114 mmol) được bổ sung trong 7 phần, tại khoảng cách 2 phút. TLC (EtOAc/Hept=2:1, RfSM=0,7, RfProd=0,0 đến 0,6) là không hoàn toàn. 2X chất phản ứng phosphoryl hóa và terazol được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Không có UPLC-MS hay TLC chỉ ra bất kỳ SM còn lại. Hỗn hợp phản ứng được chuyển vào bình chứa axetonitril (20,8 ml), nước (104 μ l, 5,776 mmol) và muối pyridin trifloroaxetat (421 mg, 2,178 mmol). Hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút. UPLC-MS chỉ ra sản phẩm mong muốn được tạo thành. Hỗn hợp phản ứng này được trộn với EtOAc và được rửa bằng HCl [0,1N]/nước muối và sau đó là NaHCO₃/nước muối để ngăn chặn sự khử bảo vệ DMT. Lớp nước được chiết ngược bằng EtOAc (1X). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên Na₂SO₄ và sau đó được lọc. Các dung môi và chất dễ bay hơi trong chất lọc được loại trên máy cô quay để thu được sản phẩm thô được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.



Chất trung gian hydro phosphonat thô được hòa tan trong DCM (2635 μ l, 40,946 mmol) và nước (29,5 μ l, 1,638 mmol) trước khi axit dicloroaxetic (135 μ l, 1,638 mmol)

trong DCM (2635 μ l, 40,946 mmol) được bổ sung ở 20°C. Hỗn hợp được khuấy ở 20°C trong 5 phút. UPLC-MS chỉ ra rằng phản ứng đã hoàn thành. Phản ứng này được trung hòa bằng (510 μ l, 6,308 mmol). Các chất dễ bay hơi được loại bỏ trên máy cô quay và sau đó là máy cô quay chân không cao. Phần cặn được đun đồng sôi bằng pyridin thêm một lần nữa trước khi được sử dụng để tạo vòng.

Hydro phosphonat được khử bảo vệ DMT thô (80 mg, 0,087 mmol) được hòa tan trong pyridin (1831 μ l, 22,639 mmol) trước khi 2-cloro-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphinan 2-oxit (48,2 mg, 0,261 mmol) được bổ sung ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. UPLC thể hiện không có đỉnh SM tại 2,1 phút. Phản ứng này được ngừng bằng cách bổ sung nước (47,1 μ l, 2,612 mmol), tiếp theo là bổ sung chất trung gian 3H-benzo[c][1,2]dithiol-3-on (21,97 mg, 0,131 mmol). Sau 10 phút, UPLC cho thấy không còn nguyên liệu ban đầu. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 phút. Không có sự thay đổi nào được phát hiện trên UPLC-MS. Hỗn hợp phản ứng được hòa tan bằng EtOAc và được rửa bằng NaHCO₃ và nước muối bão hòa. Lốp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO trước khi được lọc. Phần cặn sau khi bay hơi dung môi được hòa tan trong MeOH trước khi NH₃-H₂O được bổ sung. Hỗn hợp này được khuấy trong 5 phút trước khi tất cả dung môi và chất dễ bay hơi được loại bỏ trên máy cô quay và máy cô quay chân không cao.



Chất trung gian CDN được hòa tan trong axetonitril (1484 μ l, 28,417 mmol) và 1,4-dioxan (496 μ l, 5,797 mmol) trước khi TEA (39,6 μ l, 0,284 mmol) và 1-(bromometyl)-2-nitrobenzen (49,1 mg, 0,227 mmol) được bổ sung ở 20°C. Hỗn hợp được khuấy ở 20°C trong 16 giờ. UPLC-MS chỉ ra rằng phản ứng không hoàn toàn. Cả TLC (EtOAc) lẫn HPLC đều không chỉ ra o-nitrobenzyl bromua bất kỳ còn lại. 1-(bromometyl)-2-nitrobenzen (49,1 mg, 0,227 mmol) và TEA (39,6 μ l, 0,284 mmol)

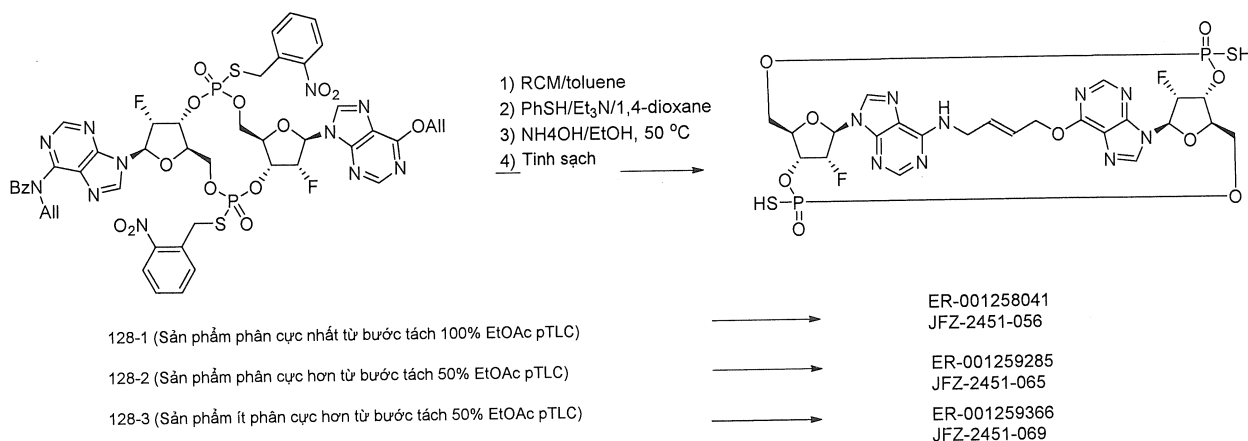
được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 giờ. Phản ứng được thực hiện với NaHCO_3 /nước muối bão hòa và được chiết bằng EtOAc/Hept. Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 và được lọc. Dung môi và các chất hữu cơ dễ bay hơi trong chất lọc được loại bỏ trên máy cô quay. Phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng Biotage (cột 12 g Si-gel, EtOAc trong Heptan=0 đến 100%, 15 thể tích, 100%, 10 thể tích, MeOH 10% trong EtOAc, 6 thể tích). Các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn được kết hợp. Làm bay hơi dung môi thu được sản phẩm mong muốn. TLC điều chế (EtOAc) được sử dụng để phân lập chất đồng phân phân cực nhất mà dẫn đến thu được thành phẩm Hợp chất 18. Hai chất đồng phân khác được phân tách bằng cách sử dụng TLC điều chế (EtOAc/DCM=1:1, chạy trong 3 lần). Chất đồng phân phân cực hơn được chuyển hóa thành Hợp chất 19 và chất đồng phân ít phân cực hơn được chuyển hóa thành Hợp chất 20.

Sản phẩm phân cực nhất từ p-TLC lần thứ nhất (EtOAc), được ký hiệu là Hợp chất 128-1: ^1H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ ppm 8,62 (s, 1 H) 8,55 (s, 1 H) 8,00 - 8,07 (m, 2 H) 7,99 (s, 1 H) 7,96 (s, 1 H) 7,56 - 7,64 (m, 2 H) 7,48 - 7,56 (m, 3 H) 7,42 - 7,48 (m, 1 H) 7,34 - 7,42 (m, 2 H) 7,29 - 7,34 (m, 1 H) 7,18 - 7,25 (m, 2 H) 6,09 - 6,21 (m, 3 H) 5,98 - 6,09 (m, 2 H) 5,63 - 5,75 (m, 1 H) 5,52 - 5,63 (m, 1 H) 5,42 - 5,51 (m, 2 H) 5,32 (dd, $J=10,27$, 0,98 Hz, 1 H) 5,27 (dd, $J=17,12$, 1,47 Hz, 1 H) 5,13 (d, $J=5,87$ Hz, 2 H) 5,09 - 5,12 (m, 1 H) 4,95 - 5,05 (m, 2 H) 4,36 - 4,54 (m, 7 H) 4,23 - 4,31 (m, 2 H) 4,15 - 4,21 (m, 1 H)

Sản phẩm phân cực hơn từ p-TLC lần thứ hai, được ký hiệu là Hợp chất 128-2 (EtOAc/DCM=1:1, 3X) ^1H NMR (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 8,75 (s, 1 H) 8,59 (s, 1 H) 8,43 (s, 1 H) 8,39 (s, 1 H) 8,01 - 8,07 (m, 2 H) 7,38 - 7,56 (m, 7 H) 7,27 - 7,35 (m, 1 H) 7,15 - 7,26 (m, 3 H) 6,45 (d, $J=19,91$ Hz, 1 H) 6,38 (d, $J=19,52$ Hz, 1 H) 5,95 - 6,26 (m, 4 H) 5,83 (dd, $J=51,54$, 4,69 Hz, 1 H) 5,73 (dd, $J=51,54$, 4,69 Hz, 1 H) 5,46 - 5,57 (m, 1 H) 5,28 - 5,36 (m, 1 H) 5,19 - 5,28 (m, 1 H) 5,16 (dt, $J=5,56$, 1,51 Hz, 2 H) 5,03 - 5,10 (m, 1 H) 4,95 (br d, $J=5,50$ Hz, 2 H) 4,41 - 4,62 (m, 4 H) 4,28 - 4,40 (m, 2 H) 4,12 - 4,27 (m, 4 H)

Sản phẩm phân cực ít hơn từ p-TLC lần thứ hai, được ký hiệu là Hợp chất 128-3 (EtOAc/DCM=1:1, 3X) ^1H NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ ppm 8,53 (s, 1 H) 8,36 (s, 1 H) 7,95 - 8,02 (m, 2 H) 7,95 (s, 1 H) 7,89 (s, 1 H) 7,53 - 7,61 (m, 2 H) 7,44 - 7,53 (m, 4 H) 7,36 - 7,44 (m, 2 H) 7,25 - 7,31 (m, 1 H) 7,12 - 7,20 (m, 2 H) 5,91 - 6,18 (m, 4 H)

5,85 - 5,91 (m, 1 H) 5,72 - 5,79 (m, 1 H) 5,61 - 5,72 (m, 1 H) 5,47 - 5,57 (m, 1 H) 5,40 - 5,47 (m, 1 H) 5,25 - 5,32 (m, 1 H) 5,15 - 5,23 (m, 1 H) 4,99 - 5,14 (m, 3 H) 4,92 (d, $J=5,47$ Hz, 2 H) 4,52 - 4,60 (m, 2 H) 4,37 - 4,52 (m, 4 H) 4,35 (d, $J=3,13$ Hz, 1 H) 4,30 (d, $J=5,47$ Hz, 1 H) 4,25 (d, $J=2,74$ Hz, 1 H) 4,20 (d, $J=4,69$ Hz, 1 H)



Bổ sung dung dịch chứa chất xúc tác Hoveyda-Grubbs thế hệ thứ hai ((1,3-Bis-(2,4,6-trimetylphenyl)-2-imidazolidinyliden)dicloro(o-isopropoxyphenylmetylen) ruteni vào dung dịch hồi lưu chứa CDN được bảo vệ 2-nitrobenzyl (10 mg, 8,696 μ mol) trong toluen (20 ml, 187,761 mmol); sẵn có tại danh mục SIGMA-ALDRITCH® số 569755; CAS 301224-40-8; 2,73 mg, 4,348 μ mol) và benzoquinon (2,350 mg, 0,022 mmol) trong TOLUEN (2 ml). Dung dịch tạo thành được tạo hồi lưu trong 4 giờ (nhiệt độ bể dầu là 120-125°C). TLC (EtOAc, $R_{fsm}=0,8$, $R_{fProd}=0,3$) và UPLC-MS chỉ ra rằng phản ứng không hoàn toàn. 1 ml dung dịch chất xúc tác Ru được bổ sung. Phản ứng này được tạo hồi lưu thêm trong 2 giờ. Vẫn còn nhiều SM không phản ứng còn lại. 1 ml khác của dung dịch chất xúc tác Ru được bổ sung. Phản ứng được tạo hồi lưu thêm trong 2 giờ nữa. Không SM nào được phát hiện trên HPLC pha đảo. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến nhiệt độ trong phòng và được ngừng bằng DMSO (0,019 ml, 0,261 mmol). Làm bay hơi dung môi thu được sản phẩm thô mà được tinh chế trên cột Si-gel (cột 10 g Si-gel, rửa giải từ 50 đến 100%, 15 thể tích, 100%, 10 thể tích). Phân đoạn chứa sản phẩm với MS mong muốn được kết hợp và được cô quay. Phần cặn được tinh chế thêm một lần trên TLC điều chế (EtOAc).

Bổ sung thiophenol (0,25 ml, 2,428 mmol) và TEA (0,25 ml, 1,794 mmol) vào CDN được khóa cầu nối được tinh chế bằng pTLC (2,5 mg, 2,228 μ mol) (chất đồng phân trans) trong 1,4-dioxan (0,5 ml, 5,845 mmol) ở 20°C. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. UPLC chỉ ra rằng sự chuyển hóa là hoàn toàn.

Metanol (1,5 ml) được bổ sung, tiếp theo là bổ sung NH_3 29% trong H_2O (1,0 ml). Hỗn hợp tạo thành được gia nhiệt ở 50°C trong 6 giờ và được làm mát đến nhiệt độ trong phòng.

Huyền phù của hỗn hợp phản ứng này được lọc và được rửa bằng nước (25 mL). Chất kết tủa được tạo thành trong chất lọc sau khi súc rửa bằng nước. Chất lọc được lọc lại để loại bỏ một số chất rắn.

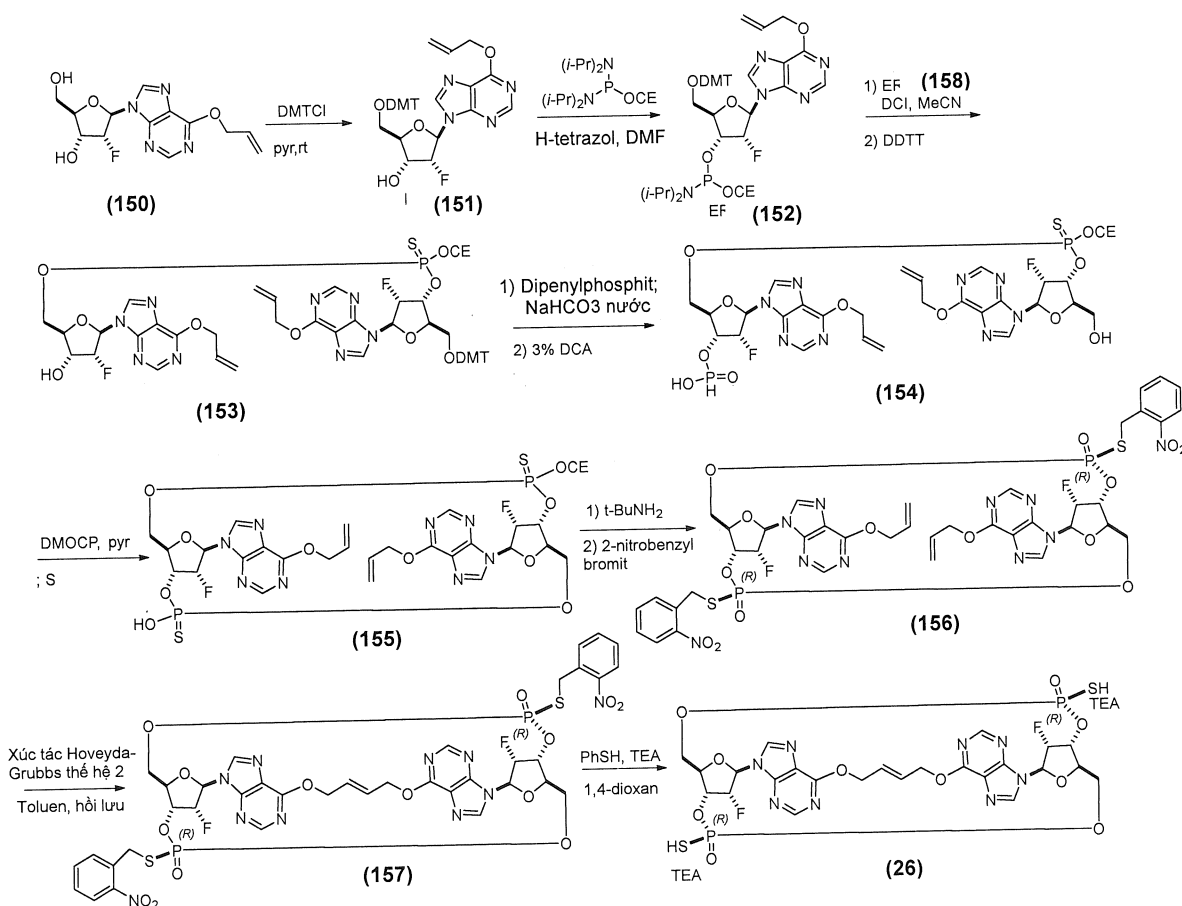
Chất lọc tạo thành được chiết bằng hỗn hợp tol/Hep (3X, 1/1, 25 ml mỗi lần). Lớp nước được cô trong chân không và sau đó được hòa tan trong nước (6 mL). Các chất kết tủa được lọc thêm một lần nữa. UPLC chỉ ra sản phẩm mong muốn được tạo thành. Sản phẩm được tinh chế với HPLC pha đảo bằng cách sử dụng cùng phương pháp để tinh chế các chất tương tự CDN được khóa nền khác.

Đối với Hợp chất 18, LCMS: MS m/z 748,11 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 746,15 $[\text{M}-\text{H}]^-$

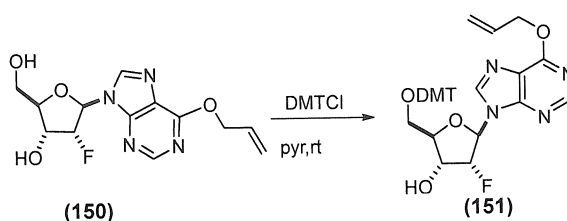
Đối với Hợp chất 19, LCMS: MS m/z 748,06 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 746,17 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Đối với Hợp chất 20, LCMS: MS m/z 748,09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 746,21 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Ví dụ 13 -- Tổng hợp Hợp chất 26



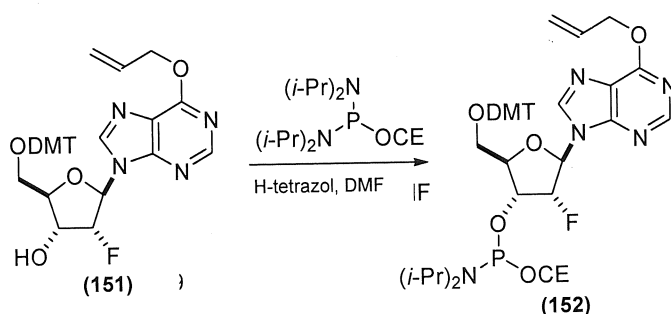
Hợp chất 151



Bổ sung 4,4'-dimethoxytrityl clorua (0,803 g, 2,369 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 150 (0,70 g, 2,256 mmol) trong pyridin (10,5 ml) 0°C. Dung dịch tạo thành được khuấy qua đêm trong khi được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), dung dịch NH₄Cl bão hòa (10 ml) và MTBE (20 mL) được bổ sung. Các lớp này được phân tách và lớp nước được chiết bằng MTBE/EtOAc (3/1, 12 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (5 ml), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂ 25 g, EtOAc 50% đến 70% trong n-heptan) thu được 0,942 g Hợp chất 151.

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,47 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,43 - 7,35 (m, 2H), 7,30 - 7,26 (m, 4H), 7,25 - 7,17 (m, 3H), 6,82 - 6,75 (m, 4H), 6,28 (dd, J = 2,3, 17,6 Hz, 1H), 6,22 - 6,10 (m, 1H), 5,63 (ddd, J = 2,7, 4,7, 53,1 Hz, 1H), 5,47 (qd, J = 1,4, 17,3 Hz, 1H), 5,31 (dd, J = 1,2, 10,6 Hz, 1H), 5,13 (t, J = 1,4 Hz, 1H), 5,12 (t, J = 1,2 Hz, 1H), 4,89 - 4,76 (m, 1H), 4,21 (td, J = 3,2, 6,8 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,55 (dd, J = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,44 (dd, J = 4,3, 10,9 Hz, 1H), 2,29 - 2,21 (m, 1H).

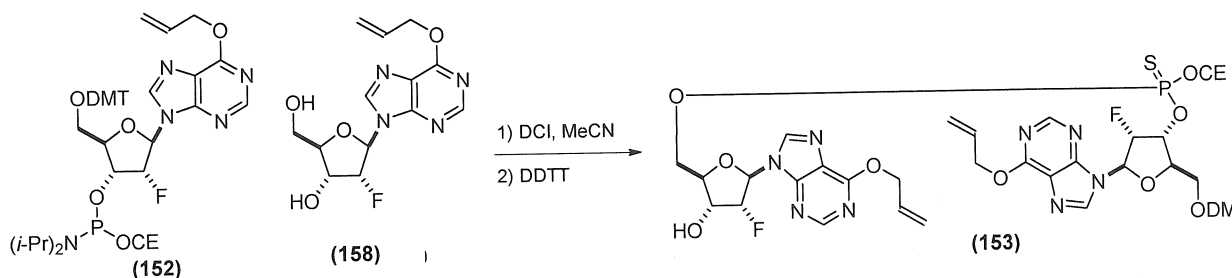
Hợp chất 152



Bổ sung 3-((bis(diisopropylamino)phosphino)oxy)propanenitril (0,927 g, 3,075 mmol), 0,45 M 1,2,3,4-tetrazol (2,8 mL, 1,2 mmol) và 1-metylimidazol (30 μ l, 0,38 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 151 (0,942 g, 1,538 mmol) trong DMF (7,5 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường

xung quanh trong 4 giờ. Khi hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), TEA (0,50 ml, 3,6 mmol), DMF (11,3 mL) và nước (1,9 mL) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được chiết bằng n-heptan (3mL mỗi lần) ba lần. Lớp DMF được hòa tan bằng nước (4 ml) và được chiết bằng hỗn hợp chứa toluen/n-heptan (1/1, 10 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% hai lần (3 mL mỗi lần), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 50 g, EtOAc 33% đến 40% trong n-heptan với TEA 1%) thu được 1,115 g Hợp chất 152 (hỗn hợp không đối quang 3:2) dưới dạng chất rắn bột màu trắng.

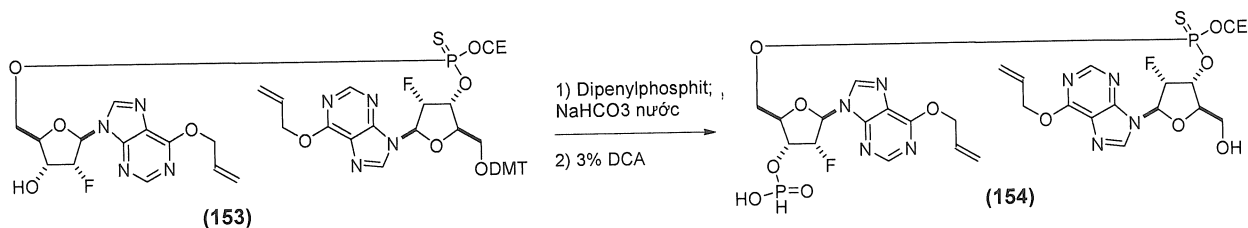
Hợp chất 153



Hỗn hợp của Hợp chất 152 (1,115 g, 1,372 mmol) và Hợp chất 158 (0,650 g, 2,095 mmol) được đun đồng sôi bằng MeCN (20 mL mỗi lần) hai lần. Phần cặn tạo thành được bổ sung MeCN (20,0 ml) và 1H-imidazol-4,5-dicarbonitril (0,243 g, 2,058 mmol). Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được xử lý bằng (E)-N,N-dimetyl-N'-(3-thioxo-3H-1,2,4-dithiazol-5-yl)formimidamit (0,422 g, 2,058 mmol). Sau khi sự lưu hóa hoàn thành, dung dịch NaHCO_3 bão hòa (20 mL) và MTBE (30 mL) được bổ sung. Các lớp này được phân tách và lớp nước được chiết bằng hỗn hợp chứa MTBE/EtOAc (15/15 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (10 mL), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 50g, EtOAc 33% đến 100% trong n-heptan với TEA 1%) thu được 0,88 g Hợp chất 153.

LC/MS (ESI) m/z 1076,48 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

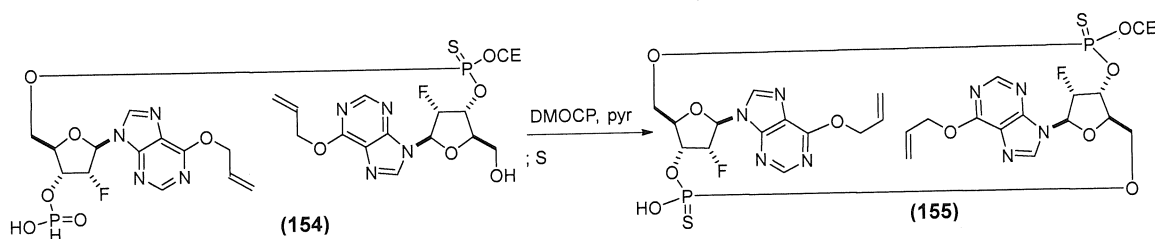
Hợp chất 154



Bổ sung diphenyl phosphit (0,323 ml, 1,67 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 153 (0,880 g, 0,835 mmol) trong pyridin (8,8 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ và được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp này được bổ sung vào hỗn hợp chứa dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (13,2 ml) và nước (4,4 ml) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 30°C, rửa bằng EtOAc (8,8 ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh và sự thủy phân được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp này được chiết hai lần bằng hỗn hợp chứa EtOAc/MTBE (1/1, 26 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (3 ml), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được đun đồng sôi bằng toluen (7 mL mỗi lần) hai lần. Sản phẩm thô được hòa tan trong diclorometan (6,6 ml), và được xử lý bằng nước (0,15 ml, 8,35 mmol) và axit dicloroaxetic 6% (0,41 ml, 5,0 mmol) trong diclorometan (6,6 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi quá trình khử bảo vệ DMT hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), triethylsilan (2,7 ml, 17 mmol) được bổ sung. Sau 10 phút khuấy, hỗn hợp tạo thành được xử lý bằng pyridin (4,4 ml) và TEA (1 ml) và được cô trong chân không. Phần cặn được tán nhỏ bằng n-heptan (8,8 ml mỗi lần) ba lần và được đun đồng sôi bằng MeCN hai lần. Sản phẩm thô (Hợp chất 154) được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC/MS (ESI) m/z 814,29 [M-H]⁻.

Hợp chất 155

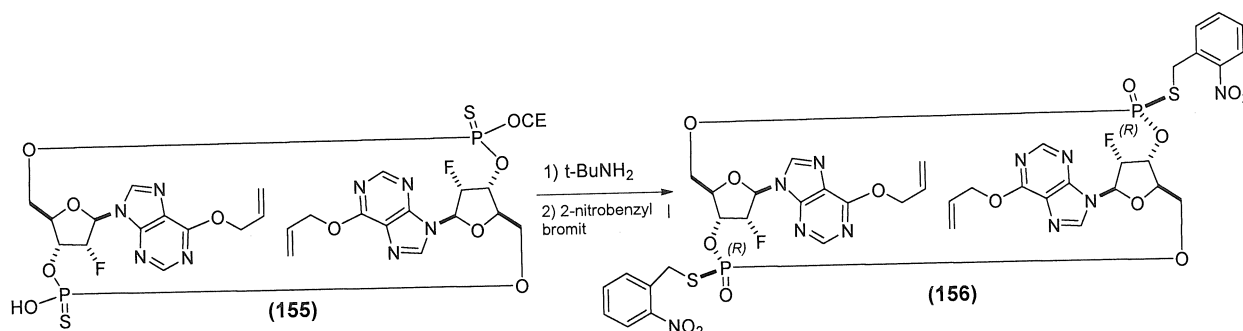


Bổ sung 2-cloro-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxit (0,462 g, 2,505 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 154 (0,681 g, 0,835 mmol) trong pyridin (68 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt

độ môi trường xung quanh và được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, nước (0,45 ml, 25 mmol) (10 đương lượng của DMOCP) và lưu huỳnh (0,134 g, 4,175 mmol) được bổ sung. Sau khi sự lưu hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được xử lý bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (13,6 ml) và được cô trong chân không. Phần cặn được xử lý bằng EtOAc (27 ml) và nước (13,6 ml). Các lớp được phân tách và lớp nước được chiết bằng hỗn hợp chứa EtOAc/MTBE (1/1, 27 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (13,6 ml), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 25 g, MeOH 0% đến 10% trong EtOAc) thu được 0,693 g (hiệu suất lý thuyết) Hợp chất 155.

LC/MS (ESI) m/z 830,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Hợp chất 156



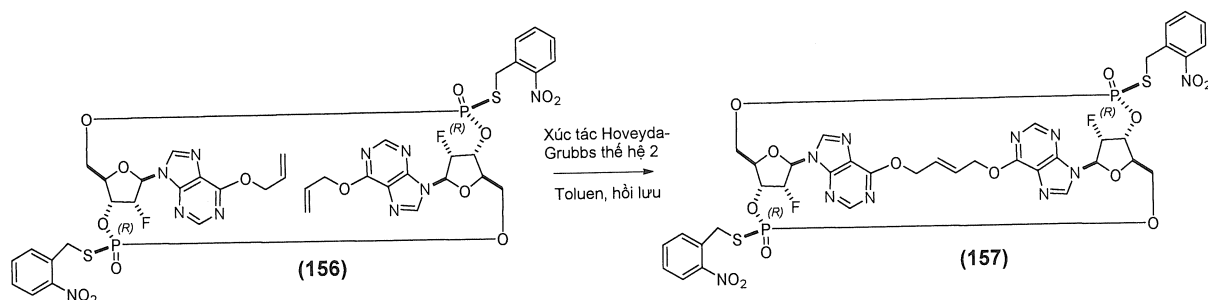
Bổ sung tert-butylamin (14 ml, 131 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 155 (0,693 g, 0,835 mmol) trong axetonitril (14 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy trong 10 phút và được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng MeCN hai lần. Phần cặn được bổ sung axetonitril (14 ml) và 2-nitrobenzyl bromua (0,541 g, 2,51 mmol). Sau khi được khuấy qua đêm, hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 100g, EtOAc 75% đến 100% trong n-heptan và MeOH 0% đến 10% trong EtOAc) để thu được 0,103 g Hợp chất 156.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,59 (s, 2H), 8,05 (br d, J = 8,2 Hz, 2H), 8,03 (s, 2H), 7,58 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,48 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,45 - 7,37 (m, 2H), 6,20 (br d, J = 18,8 Hz, 2H), 6,21 - 6,08 (m, 2H), 5,98 - 5,83 (m, 2H), 5,69 (dd, J = 4,7, 52,0 Hz, 1H), 5,47 (br d, J = 17,2 Hz, 2H), 5,31 (br d, J = 10,6 Hz, 2H), 5,14 (br d, J = 5,5

Hz, 4H), 4,54 - 4,46 (m, 2H), 4,45 - 4,40 (m, 2H), 4,37 - 4,26 (m, 4H), 4,21 - 4,11 (m, 2H).

Dựa vào phương pháp tổng hợp, số liệu NMR (đối xứng) và thời gian giữ HPLC (chất đồng phân tách rửa chậm nhất), Chủ đơn tin rằng hợp chất 156 có hóa học lập thể phospho RR. Sự thiết lập hóa học lập thể sẽ được xác nhận bằng tinh thể học tia X.

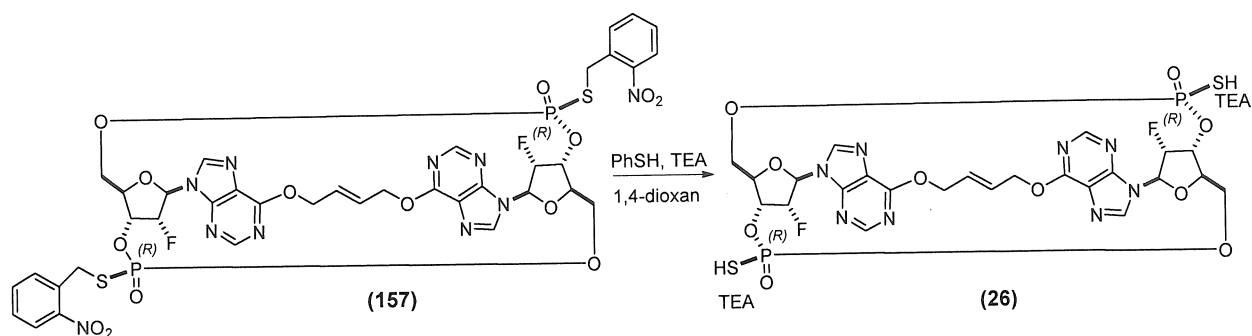
Hợp chất 157



Bổ sung dung dịch chứa chất xúc tác thể hệ thứ hai Hoveyda-Grubbs ((1,3-Bis-(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden)dichloro(o-isopropoxyphenylmetylen) ruteni vào dung dịch chứa Hợp chất 156 (0,103 g, 0,098 mmol) trong toluen (103 ml) tại hồi lưu; sẵn có tại danh mục SIGMA-ALDRITCH® số 569755; CAS 301224-40-8; 31 mg, 0,049 mmol) và quinon (32 mg, 0,295 mmol) trong toluen (10 mL). Hỗn hợp được khuấy tại hồi lưu trong 2 giờ và chất xúc tác bổ sung (16 mg, 0,025 mmol) được bổ sung. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được làm mát xuống đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được xử lý bằng DMSO (0,14 ml, 2,0 mmol) qua đêm. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂ 10g, metanol 0% đến 10% trong EtOAc) để thu được sản phẩm mong muốn, mà được tinh chế thêm bằng TLC điều chế (EtOAc) để thu được 3,6 mg hợp chất 157.

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,11 (dd, J = 1,2, 8,2 Hz, 2H), 8,09 (s, 2H), 7,68 (s, 2H), 7,67 - 7,58 (m, 4H), 7,52 - 7,48 (m, 2H), 6,26 (d, J = 17,6 Hz, 2H), 6,02 - 5,97 (m, 2H), 5,97 - 5,88 (m, 2H), 5,68 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 2H), 5,15 (br d, J = 10,9 Hz, 2H), 4,99 (br d, J = 10,9 Hz, 2H), 4,56 - 4,44 (m, 8H), 4,25 (br t, J = 6,1 Hz, 2H).

Hợp chất 26

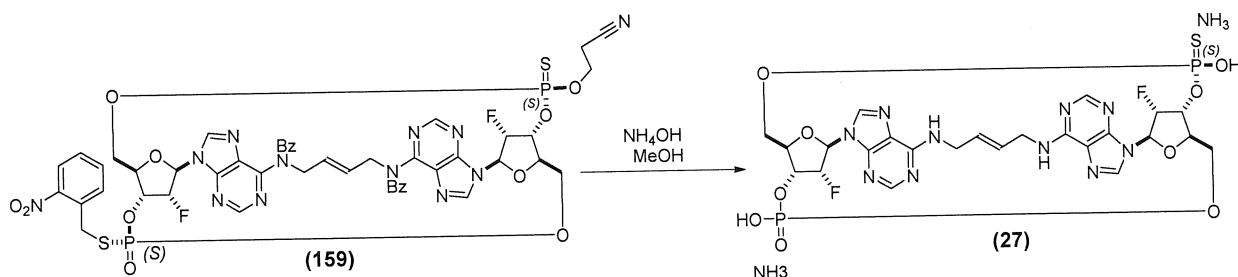


Hợp chất 157 (3,6 mg, 3,5 μ mol) được bổ sung 1,4-dioxan (0,11 mL), thiophenol (0,045 mL, 0,44 mmol) và TEA (0,054 mL, 0,39 mmol). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi chuyển hóa hoàn toàn, nước (0,5 mL) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được chiết ba lần bằng hỗn hợp chứa n-heptan/toluen (1/1, 0,4 mL mỗi lần) và sau đó là toluen (0,3 mL). Lớp nước được cô trong chân không và được xử lý bằng nước (0,5 mL). Chất rắn tạo thành được lọc ra, được rửa bằng nước (0,5 mL). Làm đông khô các chất lọc kết hợp thu được 2,0 mg muối bis-TEA Hợp chất 26 dưới dạng chất rắn bột màu trắng.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,67 (s, 2H), 8,18 (s, 2H), 6,41 (d, J = 14,8 Hz, 2H), 6,07 - 6,01 (m, 2H), 5,56 (dd, J = 3,1, 51,2 Hz, 2H), 5,48 - 5,41 (m, 2H), 5,08 (br d, J = 12,1 Hz, 2H), 4,99 - 4,88 (m, 2H), 4,52 (br d, J = 12,5 Hz, 2H), 4,40 (br d, J = 9,8 Hz, 2H), 3,98 (dd, J = 5,7, 12,3 Hz, 2H), 3,14 (q, J = 7,4 Hz, 12H), 1,27 (t, J = 7,4 Hz, 18H).

Ví dụ 15 -- Tổng hợp Hợp chất 27

Hợp chất 27 được điều chế từ Hợp chất 159, sản phẩm phụ trong Giai đoạn 11b của quy trình tổng hợp cho Hợp chất 1 được thể hiện trên FIG. 2B.

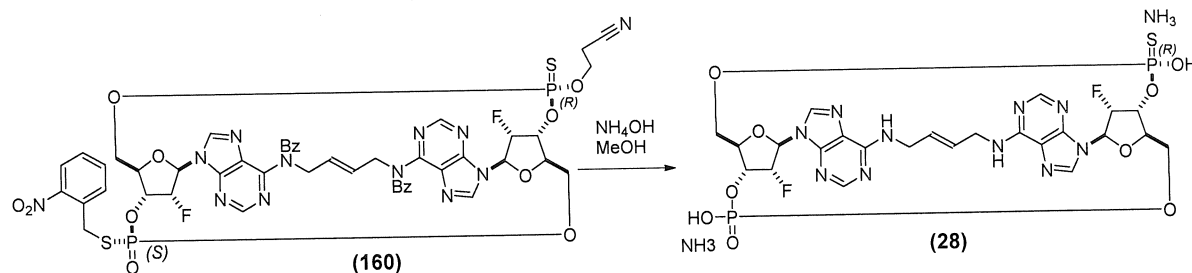


Bổ sung amoni hydroxit 28% (12 ml) vào dung dịch chứa Hợp chất 159 (2,0 g, 1,75 mmol) trong metanol (24 ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy tại 50°C trong 5 giờ và được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh,

được xử lý bằng nước (20 ml) và được chiết ba lần bằng hỗn hợp chứa toluen/EtOAc (1/1, 24 mL mỗi lần). Lớp nước được axit hóa bằng axit hydrocloric 1,0 M (3,5 ml, 3,5 mmol), được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 30 phút và 0°C trong 30 phút. Huyền phù tạo thành được lọc, được rửa bằng nước (20 mL). Bánh lọc được làm khô trong lò chân không tại 35°C qua đêm và được hòa tan bằng hỗn hợp chứa NH₄OH 28% (2 mL) và MeOH (20 mL). Dung dịch tạo thành được cô trong chân không và được xử lý bằng EtOH (4 ml) để tạo huyền phù. Chất rắn tạo thành được thu gom bằng cách lọc và được làm khô trong chân không. Thu được 70 mg Hợp chất 27 dưới dạng chất rắn màu trắng.

¹H NMR (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 9,03 (br s, 1H), 8,31 (br s, 1H), 8,26 (br s, 1H), 8,13 (br s, 1H), 6,43 - 6,24 (m, 2H), 5,97 - 5,83 (m, 2H), 5,71 (br d, J = 51,6 Hz, 1H), 5,64 (br d, J = 50,0 Hz, 1H), 5,12 - 4,99 (m, 1H), 4,96 - 4,90 (m, 1H), 4,68 - 4,32 (m, 6H), 4,14 - 3,97 (m, 2H), 3,77 - 3,62 (m, 2H).

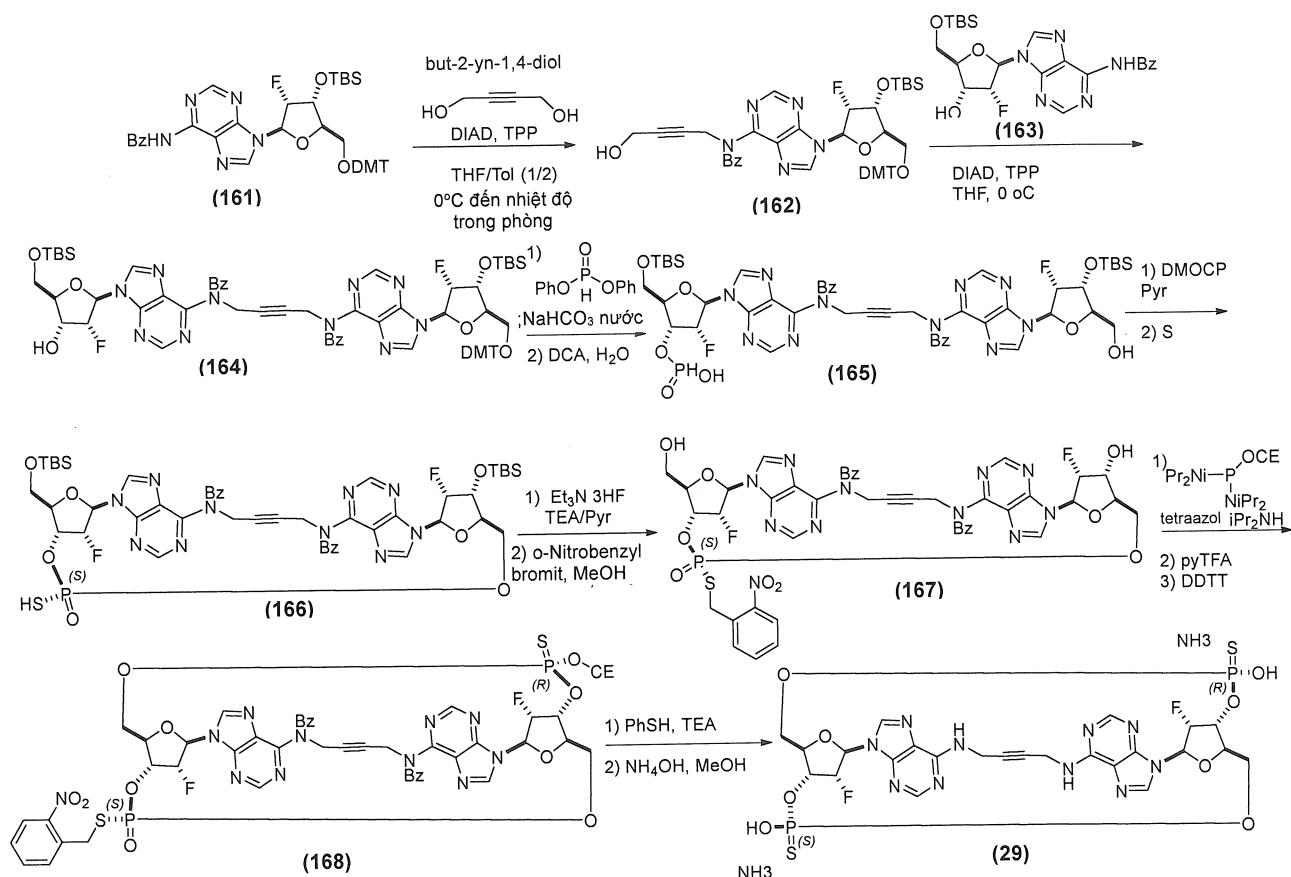
Ví dụ 16 -- Tổng hợp Hợp chất 28



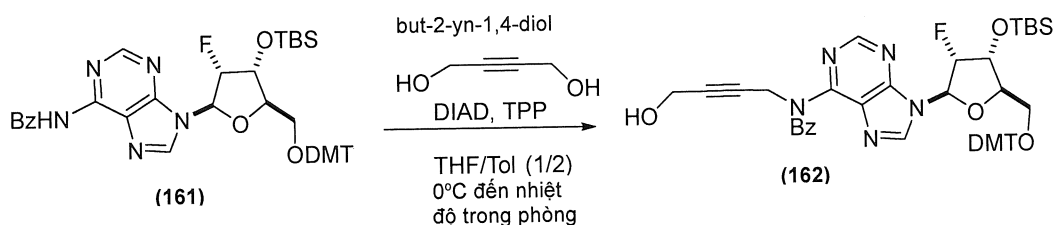
Hợp chất 28 được điều chế từ Hợp chất 160, sản phẩm trong Giai đoạn 11 của quy trình tổng hợp cho Hợp chất 1 được thể hiện trên FIG. 2B, sử dụng phương pháp giống như phương pháp dùng cho Hợp chất 27.

¹H NMR (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,70 (br s, 1H), 8,49 (br s, 1H), 8,24 (br s, 1H), 8,10 (br s, 1H), 6,52 - 6,26 (m, 2H), 5,94 - 5,78 (m, 2H), 5,69 (br d, J = 54,7 Hz, 1H), 5,48 - 5,26 (m, 1H), 5,14 (br d, J = 53,1 Hz, 2H), 5,06 - 4,94 (m, 1H), 4,74 - 4,19 (m, 4H), 4,10 - 3,93 (m, 2H), 3,76 - 3,58 (m, 2H)

Ví dụ 17 -- Tổng hợp Hợp chất 29



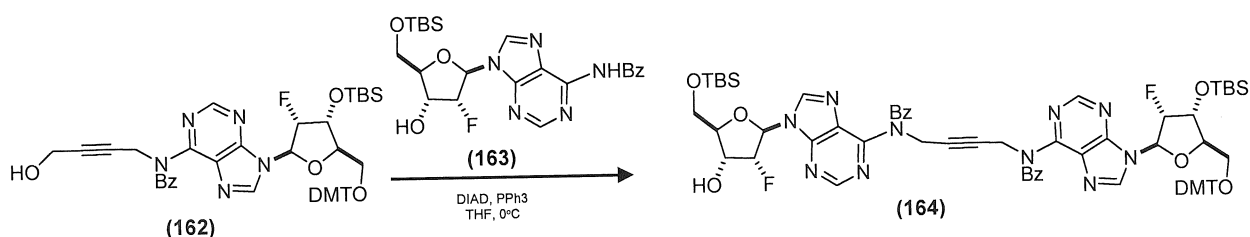
Hợp chất 162



Hợp chất 161 (5,0 g, 6,329 mmol) và but-2-yn-1,4-diol (1,907 g, 22,153 mmol) được đun đồng sôi bằng THF hai lần. Phần cặn được hòa tan trong THF (50,0 ml) và toluen (75 ml). Triphenylphosphin (2,158 g, 8,228 mmol) được bổ sung và dung dịch tạo thành được làm mát xuống dưới 5°C . DIAD (1,60 ml, 8,23 mmol) được bổ sung nhỏ giọt trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 10°C . Dung dịch tạo thành được khuấy ở 0°C đến 5°C trong khi quá trình này được theo dõi bằng LCMS. Sau khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không để loại bỏ hầu hết THF. Phần cặn được hòa tan bằng MTBE (50,0 ml) và được rửa hai lần bằng dung dịch nước NaCl 30% (40,0 ml mỗi lần) và hai lần bằng nước (25 ml mỗi lần). Dung dịch hữu cơ này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 100g, EtOAc 50% đến 70% trong n-heptan được tạo đệm bằng TEA 1%) để thu được 4,671 g Hợp chất 162.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,61 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,43 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,33 - 7,27 (m, 3H), 7,24 - 7,18 (m, 8H), 7,05 - 7,01 (m, 2H), 6,76 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 6,20 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,59 (td, J = 3,1, 53,1 Hz, 1H), 5,19 (br d, J = 2,3 Hz, 2H), 4,93 - 4,83 (m, 1H), 4,18 - 4,15 (m, 1H), 4,01 (br d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,53 (dd, J = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,17 (dd, J = 3,7, 11,1 Hz, 1H), 0,85 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,02 (s, 3H).

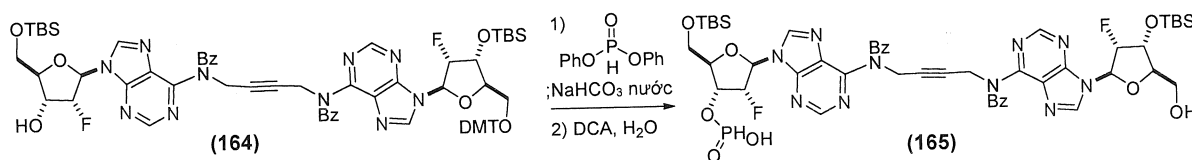
Hợp chất 164



Hợp chất 162 (4,671 g, 5,444 mmol), Hợp chất 163 (3,32 g, 6,805 mmol) và triphenyl phosphin (1,856 g, 7,077 mmol) được hòa tan trong THF (56,1 ml) và được làm mát dưới 5°C . Dung dịch tạo thành được bổ sung DIAD (1,3 ml, 6,8 mmol) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 10°C . Sau khi dùng hết Hợp chất 162 (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 340 g, EtOAc 55% đến 70% trong n-heptan được tạo đệm bằng TEA 1%) để thu được 3,879 g Hợp chất 164 dưới dạng chất rắn bột màu trắng.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,51 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,36 - 7,32 (m, 4H), 7,28 - 7,13 (m, 8H), 6,98 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 6,79 - 6,74 (m, 4H), 6,29 (dd, J = 2,0, 16,4 Hz, 1H), 6,19 (dd, J = 2,7, 17,2 Hz, 1H), 5,53 (ddd, J = 2,7, 4,7, 53,1 Hz, 1H), 5,33 (ddd, J = 2,0, 3,9, 53,1 Hz, 1H), 5,23 - 5,21 (m, 1H), 5,05 - 5,01 (m, 2H), 4,99 - 4,94 (m, 2H), 4,81 (ddd, J = 4,3, 6,7, 16,7 Hz, 1H), 4,71 - 4,60 (m, 1H), 4,21 - 4,14 (m, 2H), 4,08 - 4,03 (m, 1H), 3,89 (dd, J = 3,1, 11,7 Hz, 1H), 3,77 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 6H), 0,00 (s, 3H).

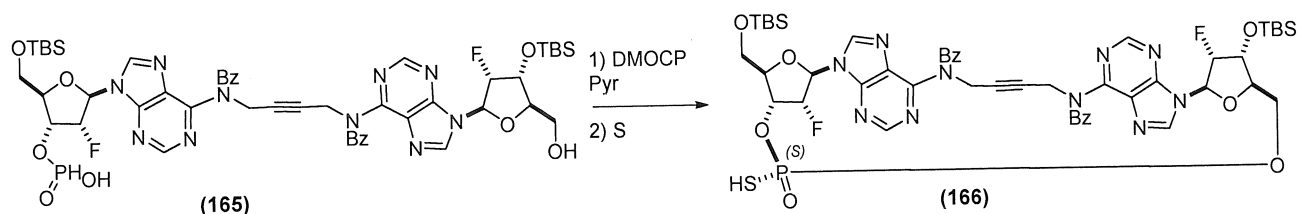
Hợp chất 165



Bổ sung diphenyl phosphit (0,35 ml, 1,8 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 164 (1,5 g, 1,13 mmol) trong pyridin (12,0 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được bổ sung vào hỗn hợp chứa Dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (22,5 ml) và nước (7,5 ml) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 30°C. Sau khi quá trình thủy phân hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp tạo thành được chiết hai lần bằng hỗn hợp chứa EtOAc/MTBE (30,0/30,0 ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (15,0 ml), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được đun đồng sôi bằng toluen ba lần và được hòa tan trong diclorometan (11 ml), nước (0,20 ml, 11 mmol) và axit dicloroaxetic 6% (0,57 ml, 6,9 mmol) trong diclorometan (11 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi loại bỏ hoàn toàn nhóm DMT (được theo dõi bằng LCMS), triethylsilan (1,8 ml, 11 mmol) được bổ sung. Sau 10 phút khuấy, TEA (1,6 ml, 11 mmol) được bổ sung và hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc (22,5 ml), được rửa bằng nước (3,8 ml) và dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (8%) (3,0 ml), được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được cô trong chân không. Sản phẩm thô được tán nhỏ hai lần bằng n-heptan (33,8 ml) và hỗn hợp chứa n-heptan (9,0 ml) và toluen (3,0 ml). Dịch nổi được gạn ra và chất rắn còn lại ở đáy được hòa tan trong axetonitril. Dung dịch tạo thành được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng axetonitril hai lần. Sản phẩm thô, Hợp chất 165, được sử dụng cho giai đoạn tiếp theo mà không tinh chế (giả định hiệu suất lý thuyết 100%).

LC/MS (ESI) m/z 1089,74 [M+H]⁺.

Hợp chất 166

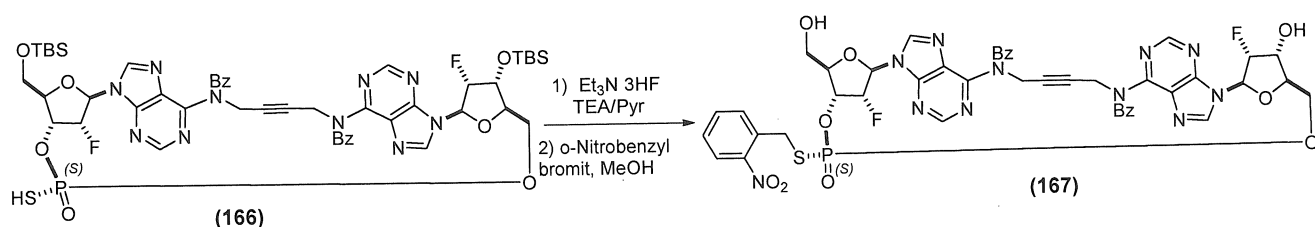


Bổ sung TEA (0,47 ml, 3,4 mmol) và DMOCP (0,375 mg, 2,03 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 165 (1,231 g, 1,13 mmol) trong pyridin (100 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, nước (0,41 mL, 22,6 mmol) và

sau đó là lưu huỳnh (0,181 g, 5,651 mmol) được bổ sung. Sau khi lưu hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), Dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (8%) (24,6 ml) và nước (10 mL) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không đến ~50 mL và được chiết hai lần bằng hỗn hợp chứa MTBE/EtOAc (31/31 ml) mỗi lần. Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (25 ml), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, được cô trong chân không, và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 100g, metanol 0 đến 10% trong etyl axetat được tạo đệm bằng TEA 1%) để thu được Hợp chất 166 (0,484 g).

LC/MS (ESI) m/z 1103,65 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

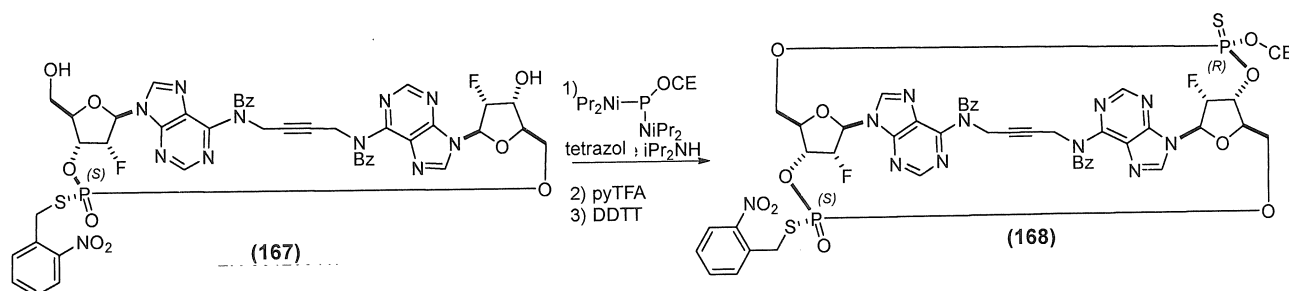
Hợp chất 167



Bổ sung Et_3N 3HF (0,581 ml, 3,563 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 166 (0,484 g, 402 mmol) trong pyridin (1,2 ml) và TEA (5,8 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Sau khi chuyển hóa hoàn thành, metoxytrimetylsilan (3,9 ml, 28 mmol) được bổ sung. Sau 20 phút khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh, dịch nổi được gạn. Phần cặn được bổ sung toluen (5 mL) và sau 10 phút khuấy, lớp toluen được gạn. Công đoạn tương tự được lặp lại thêm một lần nữa. Sản phẩm thô tạo thành được hòa tan trong diclorometan (10 mL), được rửa bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (27% khối lượng) (5 ml) và NaCl nước 30% (2,4 ml), và được làm khô trên MgSO_4 . Thực hiện lọc, tiếp theo là cô đặc lớp hữu cơ tạo thành thu được 0,386 g chất rắn màu nâu nhạt mà được đun đồng sôi bằng MeCN hai lần. Sản phẩm thô tạo thành được hòa tan trong MeCN (4,6 ml) và được xử lý bằng 2-nitrobenzyl bromua (0,103 g, 0,475 mmol) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi sự alkyl hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica-gel (SiO_2 25g, MeOH 0 đến 5% trong EtOAc) để thu được 0,251 g Hợp chất 167 dưới dạng chất rắn màu trắng.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,42 (br s, 1H), 8,31 (br s, 1H), 8,22 (br s, 1H), 8,10 - 8,04 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,53 - 7,37 (m, 8H), 7,32 - 7,27 (m, 3H), 7,24 - 7,16 (m, 2H), 6,18 (br d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,26 - 6,14 (m, 1H), 5,56 (d, J = 53,1 Hz, 1H), 5,48 - 5,37 (m, 1H), 5,31 (br s, 1H), 5,15 (br d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,82 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,88 - 4,77 (m, 1H), 4,76 - 4,66 (m, 1H), 4,58 - 4,33 (m, 3H), 4,29 (br d, J = 5,9 Hz, 1H), 4,21 (br s, 1H), 4,13 - 4,06 (m, 1H), 3,93 - 3,79 (m, 2H).

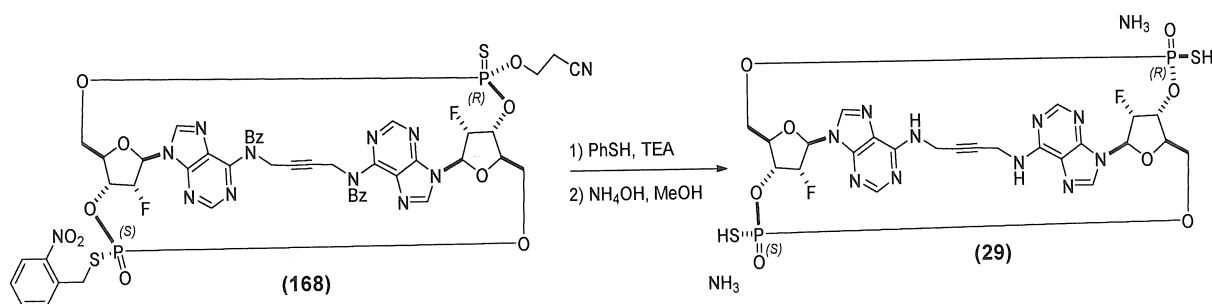
Hợp chất 168



Hợp chất 167 (0,224 g, 0,222 mmol) và 3-(Bis(diisopropylamino)phosphinoxy)propanenitril (0,081 ml, 0,255 mmol) được hòa tan trong MeCN (5 mL) và được cô. Công đoạn tương tự được lặp lại thêm hai lần nữa. Hỗn hợp tạo thành được hòa tan trong diclorometan (2,2 ml), được làm mát đến 0°C, và được xử lý bằng diisopropylamoni tetrazolit (0,019 g, 0,111 mmol). Hỗn hợp phản ứng được đưa đến nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm và được hòa tan bằng MeCN (2,2 mL). Dung dịch tạo thành được bổ sung trong 10 giờ qua bơm tiêm vào dung dịch chứa muối pyridin trifloroaxetat (0,129 g, 0,665 mmol) trong MeCN (18 ml). Sau 1 giờ khuấy bổ sung, 3-(Bis(diisopropylamino)phosphinoxy)propanenitril (0,04 mL, 0,12 mmol) trong MeCN (1 mL) được bổ sung trong 4 giờ. (E)-N,N-dimetyl-N'-(3-thioxo-3H-1,2,4-dithiazol-5-yl)formimidamit (0,064 g, 0,311 mmol) được bổ sung. Sau khi lưu hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và cặn tạo thành được hấp thụ bằng MTBE (4,5 ml). Hỗn hợp hữu cơ tạo thành được rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (8%) (4 ml) và nước (2 ml). Các lớp nước kết hợp được chiết ngược bằng hỗn hợp chứa MTBE/EtOAc (4/4 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa hai lần bằng dung dịch nước NaCl 30% (2 mL mỗi lần), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc, được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 25g, EtOAc 50% đến 100% trong n-heptan) để thu được 64 mg Hợp chất 168.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,57 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,06 - 8,01 (m, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,62 - 7,56 (m, 2H), 7,55 - 7,50 (m, 2H), 7,49 - 7,43 (m, 3H), 7,42 - 7,34 (m, 2H), 7,30 - 7,18 (m, 5H), 6,33 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 6,10 (d, J = 20,7 Hz, 1H), 5,95 - 5,77 (m, 1H), 5,54 (dd, J = 4,3, 52,8 Hz, 1H), 5,46 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 1H), 5,32 - 5,18 (m, 1H), 5,10 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,89 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,85 - 4,81 (m, 2H), 4,78 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,64 (br dd, J = 4,1, 9,2 Hz, 1H), 4,55 (dd, J = 2,7, 12,1 Hz, 1H), 4,52 - 4,44 (m, 3H), 4,38 - 4,20 (m, 4H), 2,75 (td, J = 6,3, 17,6 Hz, 1H), 2,58 (td, J = 5,9, 17,2 Hz, 1H).

Hợp chất 29

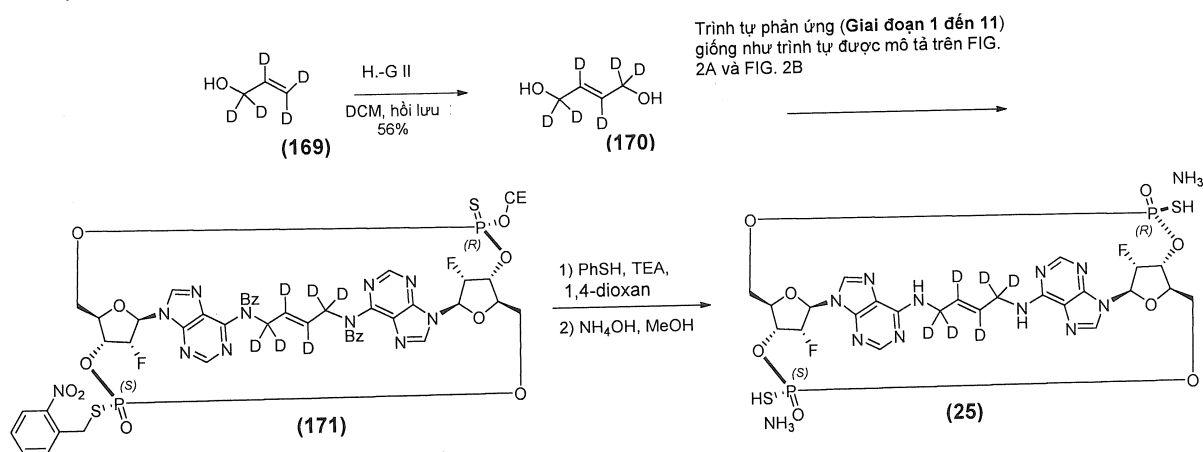


Bổ sung thiophenol (0,24 ml, 2,3 mmol) và TEA (0,24 ml, 1,7 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 168 (40 mg, 0,035 mmol) trong 1,4-dioxan (0,5 mL). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, metanol (0,64 ml) và amoni hydroxit 28% (0,64 ml) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được gia nhiệt đến 50°C, được khuấy trong 5 giờ và được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Khi khử bảo vệ hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp tạo thành được xử lý bằng nước (0,80 ml) và được chiết ba lần bằng hỗn hợp chứa n-heptan/toluen (1/1, 0,5 mL mỗi lần) và sau đó là toluen (0,3 ml). Lớp nước được cô trong chân không ở 40-50°C và được xử lý bằng nước (1 mL). Chất rắn tạo thành được lọc ra, được rửa bằng nước (0,3 ml). Các chất lọc kết hợp được xử lý bằng 1,0 M HCl (0,07 ml, 0,07 mmol). Huyền phù tạo thành được lọc và được rửa bằng nước (1 mL). Bánh lọc được hòa tan bằng dung dịch amoniac 2,0 M (1,0 ml, 2,0 mmol) trong MeOH. Dung dịch tạo thành được cô trong chân không đến 0,5 mL và được xử lý bằng EtOH (0,5 ml). Công đoạn tương tự được lặp lại thêm hai lần nữa. Bổ sung nhỏ giọt EtOAc (0,9 mL) vào dung dịch tạo thành. Sự kết tủa xảy ra. Chất rắn tạo thành được thu gom bằng cách lọc, được rửa bằng hỗn hợp 4/1 của EtOAc/EtOH (0,4

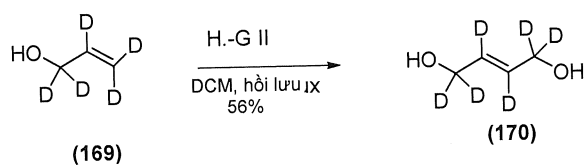
mL) và được làm khô trong chân không qua đêm ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Thu được 12 mg Hợp chất 29.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,88 (br s, 1H), 8,50 (br s, 1H), 8,20 (br s, 1H), 8,12 (br s, 1H), 6,42 - 6,17 (m, 2H), 5,84 - 5,54 (m, 1H), 5,52 (d, J = 51,6 Hz, 1H), 5,06 - 4,78 (m, 2H), 4,77 - 4,55 (m, 3H), 4,49 (br d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,42 (br s, 2H), 4,09 - 3,77 (m, 4H).

Ví dụ 18 -- Tổng hợp Hợp chất 25



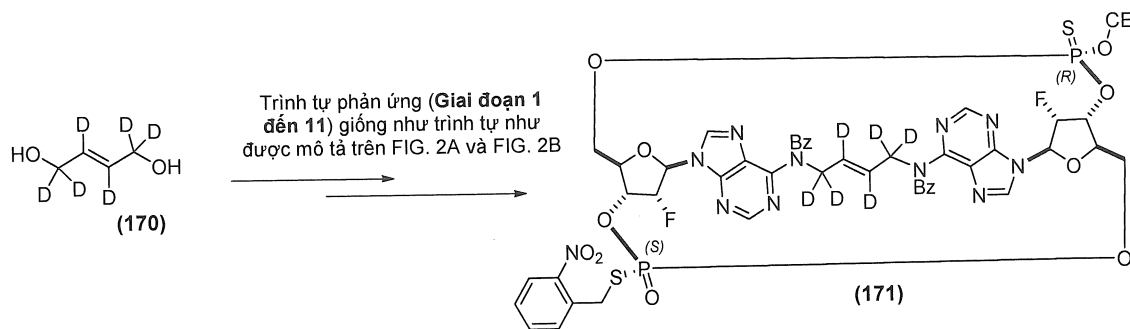
Hợp chất 170



Bổ sung prop-2-en- d_5 -1-ol (10,0 g, 158 mmol) vào dung dịch chứa chất xúc tác thế hệ thứ hai Hoveyda-Grubbs (0,996 g, 1,585 mmol) trong diclorometan (40,0 ml) tại hồi lưu. Sau 1 giờ, chất xúc tác thế hệ thứ hai Hoveyda-Grubbs 1% mol bổ sung (0,996 g, 1,585 mmol) được bổ sung. Dung dịch tạo thành được khuấy tại hồi lưu qua đêm, được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh, và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 340g MeOH 0% đến 10% trong EtOAc) để thu được 4,2 g Hợp chất 170 dưới dạng dầu màu nâu.

^{13}C NMR (101 MHz, METANOL- d_4) δ = 130,87 (t, J = 23,8 Hz, 2C), 62,22 (quin, J = 21,9 Hz, 2C).

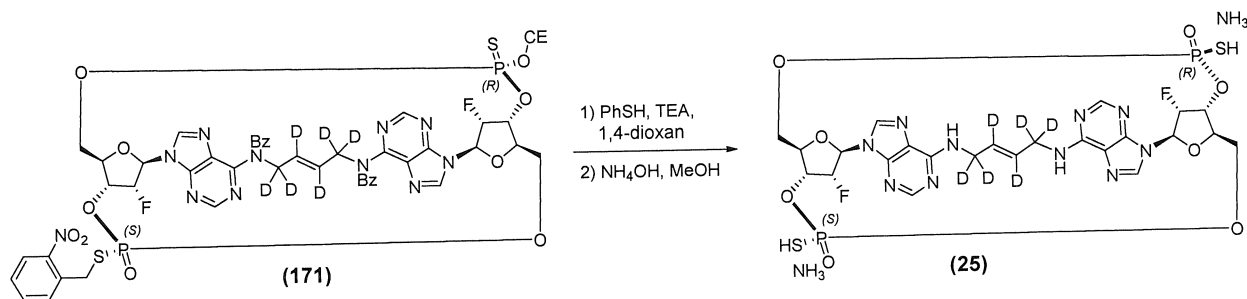
Hợp chất 171



Với Hợp chất 170 làm nguyên liệu ban đầu, các hợp chất Hợp chất 171 được điều chế thông qua trình tự phản ứng (Giai đoạn 1 đến 11) giống như trình tự được mô tả trong quy trình tổng hợp Hợp chất 1 trên FIG. 2A và FIG. 2B.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,59 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,02 - 7,96 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,58 - 7,50 (m, 2H), 7,48 - 7,37 (m, 5H), 7,34 - 7,27 (m, 2H), 7,24 - 7,14 (m, 4H), 6,90 (s, 1H), 6,28 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 6,14 - 6,03 (m, 1H), 5,97 - 5,81 (m, 1H), 5,49 (dd, J = 4,7, 52,3 Hz, 2H), 5,43 (dd, J = 3,9, 50,8 Hz, 1H), 5,30 - 5,15 (m, 1H), 4,75 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,61 (br dd, J = 4,3, 9,4 Hz, 1H), 4,53 (dd, J = 2,9, 11,9 Hz, 1H), 4,47 - 4,41 (m, 3H), 4,32 - 4,18 (m, 4H), 2,79 (td, J = 7,0, 17,2 Hz, 1H), 2,66 (td, J = 6,3, 16,8 Hz, 1H)

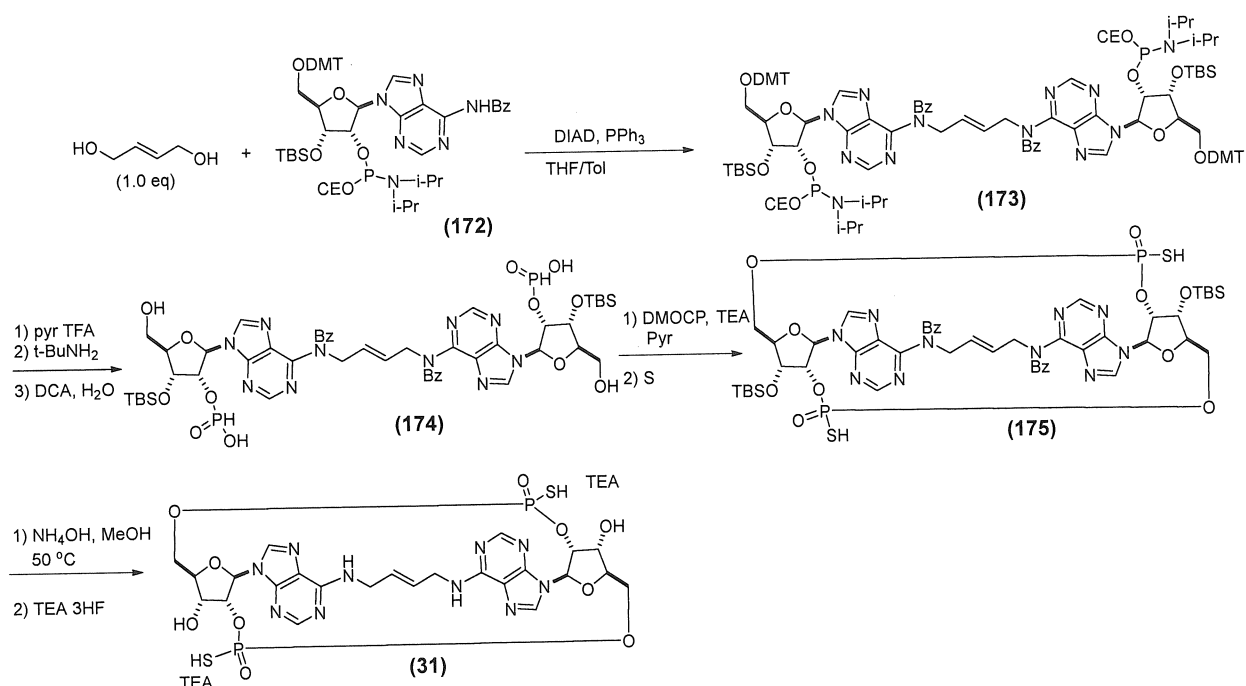
Hợp chất 25



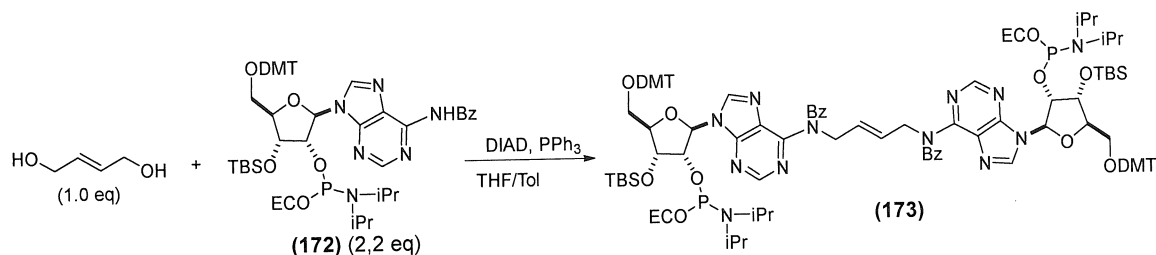
Với Hợp chất 171 làm nguyên liệu ban đầu, Hợp chất 25 được điều chế thông qua trình tự phản ứng (Giai đoạn 12-13) giống như trình tự được mô tả trên FIG. 2A và FIG. 2B.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 9,03 (br s, 1H), 8,30 (br s, 1H), 8,24 (br s, 1H), 8,10 (br s, 1H), 6,44 - 6,13 (m, 2H), 0,00 (d, J = 52,4 Hz, 1H), 0,00 (d, J = 51,2 Hz, 1H), 4,71 - 4,32 (m, 6H), 4,09 - 3,98 (m, 1H), 3,97 - 3,87 (m, 1H).

Ví dụ 19 -- Tổng hợp Hợp chất 31 (RpRp hoặc SpSp)

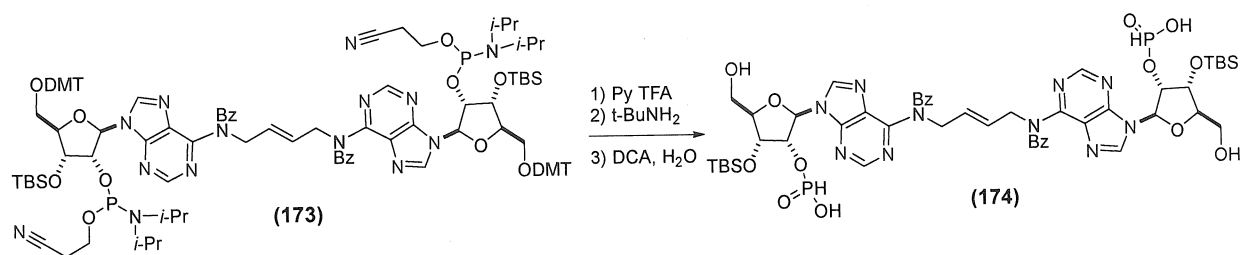


Hợp chất 173



Hỗn hợp chứa (E)-but-2-en-1,4-diol (0,10 g, 1,135 mmol) và Hợp chất 172 (2,52 g, 2,55 mmol) được đun đồng sôi bằng THF hai lần và được hòa tan trong THF (5,0 ml) và toluen (7,5 ml). Dung dịch tạo thành được bổ sung triphenylphosphin (0,714 g, 2,724 mmol). Dung dịch tạo thành được làm mát xuống dưới 5°C và được xử lý bằng DIAD (0,53 ml, 2,72 mmol) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 10°C. Hỗn hợp phản ứng tạo thành được khuấy qua đêm trong khi được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂ 50g được xử lý sơ bộ bằng TEA 1% trong n-heptan/EtOAc (1/1), EtOAc 50% đến 66% trong n-heptan) để thu được 2,46 g Hợp chất 173 dưới dạng chất rắn bột màu trắng. Nguyên liệu này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

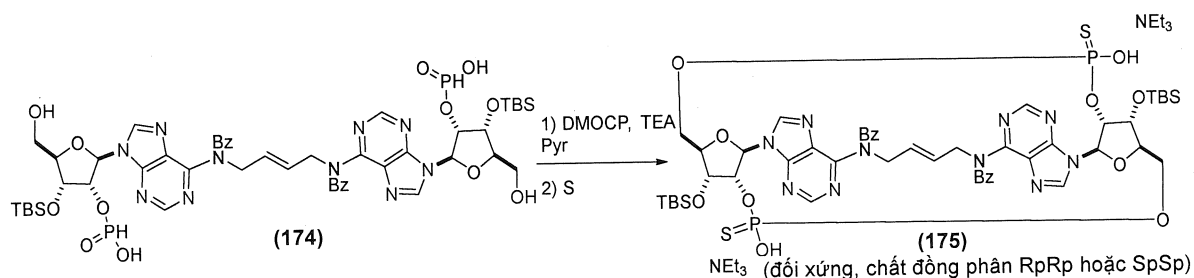
Hợp chất 174



Bổ sung nước (0,085 ml, 4,7 mmol), muối pyridin trifloroaxetat (0,500 g, 2,589 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 173 (2,387 g, 1,177 mmol) trong axetonitril (28,6 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau 1 phút, 2-amino-2-metylpropan (19,1 ml, 182 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng MeCN. Phần cặn được hòa tan trong diclorometan (24 mL) và được xử lý bằng nước (0,42 ml) và axit dicloroaxetic 6% (1,2 ml, 14 mmol) trong diclorometan (24 ml). Sau khi khử bảo vệ DMT hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), phản ứng được ngừng bằng pyridin (12 ml) và hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không. Phần cặn tạo thành được xử lý bằng hỗn hợp chứa n-heptan/toluen (15/15 ml) và lớp trên được gạn. Công đoạn tương tự được lặp lại thêm một lần nữa. Làm khô cặn tạo thành trong chân không thu được Hợp chất 174 được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

LC/MS (ESI) m/z 1151,64 $[M+H]^+$.

Hợp chất 175

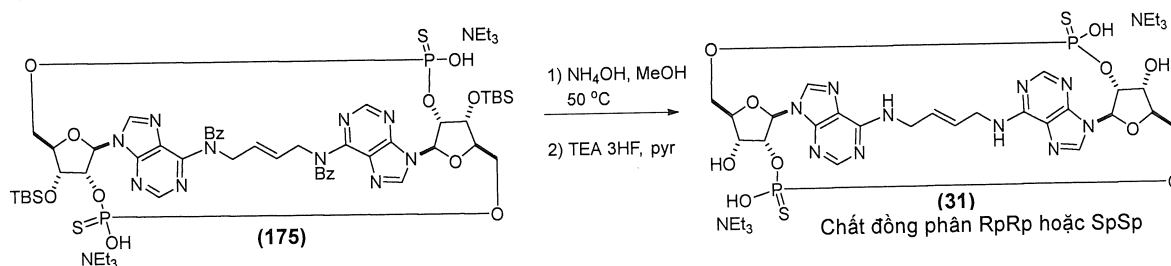


Bổ sung TEA (0,98 ml, 7,1 mmol) và 2-cloro-5,5-dimetyl-1,3,2-dioxaphosphinan 2-oxit (0,869 g, 4,708 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 174 (1,355 g, 1,177 mmol) trong pyridin (271 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh tới khi tất cả nguyên liệu ban đầu được sử dụng (được theo dõi bằng LCMS). Sau khi phản ứng hoàn thành, nước (0,85 ml, 47

mmol) (10 đương lượng của DMOCP) và sau đó lưu huỳnh (0,377 g, 11,77 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau khi quá trình lưu hóa hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được xử lý bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (27 ml) và nước (10 mL), và được cô trong chân không. Bổ sung hỗn hợp chứa MTBE/EtOAc (34/34 ml), dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (27 ml) và nước (20 mL) vào cặn tạo thành. Các lớp được tách và lớp nước được chiết bằng hỗn hợp chứa EtOAc/MTBE (34/34 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (7 ml), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 50g, MeOH 0% đến 20% trong EtOAc với TEA 1%) để thu được 56 mg Hợp chất 175 (đối xứng dựa trên NMR; chất đồng phân RpRp hoặc SpSp).

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 9,09 (s, 2H), 8,46 (s, 2H), 7,56 - 7,05 (m, 10H), 6,37 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 6,28 - 6,22 (m, 2H), 5,29 (ddd, J = 4,7, 7,8, 11,7 Hz, 2H), 5,00 (br d, J = 13,7 Hz, 2H), 4,84 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 4,76 (br d, J = 13,3 Hz, 2H), 4,31 (br s, 2H), 4,28 - 4,20 (m, 2H), 4,16 - 4,08 (m, 2H), 3,00 - 2,77 (m, 12H), 1,12 - 0,99 (m, 18H), 0,96 (s, 18H), 0,34 (s, 6H), 0,25 (s, 6H).

Hợp chất 31

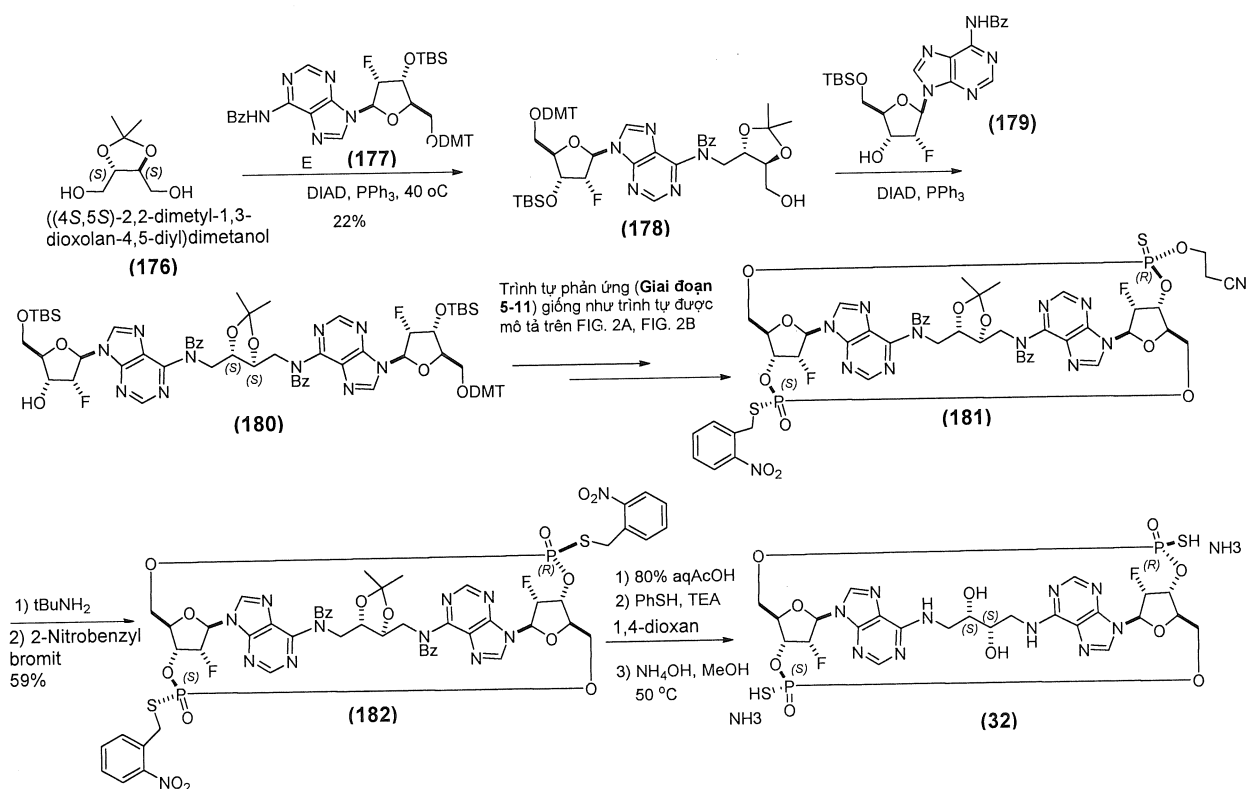


Bổ sung amoni hydroxit 28% (0,22 mL) vào dung dịch chứa Hợp chất 175 (56 mg, 0,0405 mmol) trong metanol (1,1 mL). Hỗn hợp tạo thành được khuấy tại 50°C trong 5 giờ, được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh, được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng MeCN hai lần. Phần cặn tạo thành được bổ sung pyridin (0,22 mL), TEA (0,11 mL) và TEA 3HF (0,11 mL, 0,69 mmol). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở 50°C trong 5 giờ, được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh, được xử lý bằng metoxytrimetyl silan (0,90 mL, 6,50 mmol) trong 30 phút. Hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không và được hòa tan trong nước (5 mL). Dung dịch nước tạo thành được chiết ba lần bằng toluen (5 mL mỗi lần) và được cô trong chân không. Sản phẩm thô được hòa tan trong 1mL nước, được lọc qua bộ lọc ống tiêm và

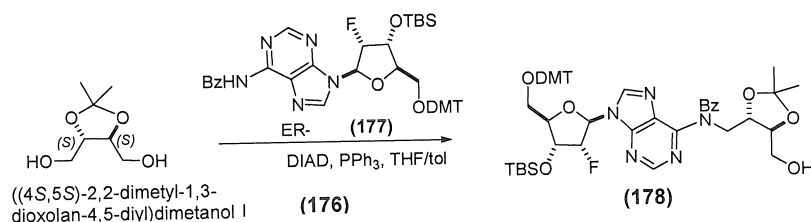
được axit hóa bằng 1N HCl để tạo pH<3. Hỗn hợp tạo thành được giữ trong tủ lạnh (5°C) trong 2 ngày và chất rắn tạo thành được gom bằng cách lọc. Chất rắn được hòa tan trong NH₃ 2M trong MeOH (1,5 ml) và được cô trong chân không để thu được 2,8 mg Hợp chất 31 là hỗn hợp chứa NH₃ và muối TEA. Sản phẩm này được hòa tan trong EtOH (1 mL), được xử lý bằng 0,1 ml TEA, được cô đến 0,5 mL và được giữ trong tủ đông (-20°C) qua đêm. Dịch nổi được loại bỏ và chất rắn còn lại được làm khô thêm trong chân không để thu được 0,8 mg muối bis TEA Hợp chất 31 (đối xứng bởi NMR; chất đồng phân RpRp hoặc SpSp).

¹H NMR (400 MHz, METANOL-d₄) δ = 8,26 - 7,83 (m, 4H), 6,37 (br s, 2H), 5,89 (br s, 2H), 5,36 - 5,07 (m, 2H), 4,95 (br d, J = 3,5 Hz, 2H), 4,58 (br dd, J = 6,3, 10,6 Hz, 2H), 4,43 (br s, 2H), 4,12 - 4,00 (m, 4H), 3,89 - 3,70 (m, 2H), 3,19 (q, J = 7,2 Hz, 12H), 1,30 (t, J = 7,4 Hz, 18H)

Ví dụ 20 -- Tổng hợp Hợp chất 32



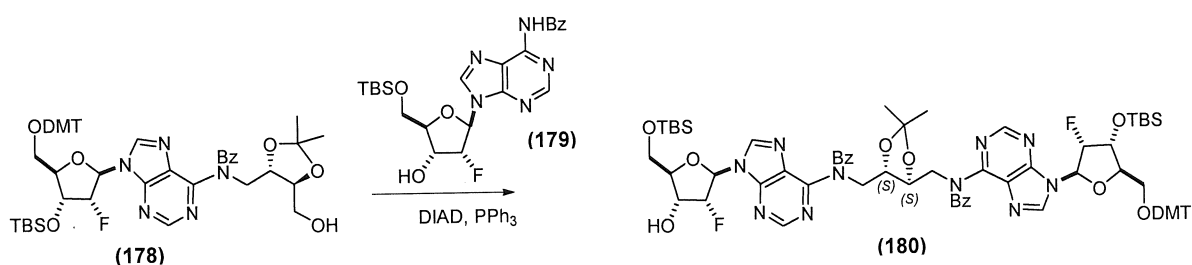
Hợp chất 178



Bổ sung triphenylphosphin (0,930 g, 3,544 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 177 (2,0 g, 2,532 mmol) và (+)-2,3-O-isopropyliden-L-threitol (Hợp chất 176) (1,232 g, 7,595 mmol) trong THF (20,0 ml) và toluen (30,0 ml). Dung dịch tạo thành được làm mát xuống dưới 5°C và được xử lý bằng DIAD (0,64 ml, 3,3 mmol). Hỗn hợp phản ứng này được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau 8 giờ khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh, thêm DIAD (0,64 mL) và PPh₃ (0,93 g) được bổ sung. Sau khi khuấy qua đêm ở nhiệt độ môi trường xung quanh, hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở 40°C trong 2 ngày và được cô trong chân không. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂ 100g được xử lý sơ bộ bằng TEA 1% trong n-heptan/EtOAc (1/1), EtOAc 50% đến 70% trong n-heptan) thu được 0,524 g Hợp chất 178 dưới dạng chất rắn bột màu trắng.

¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,62 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,40 - 7,09 (m, 12H), 7,01 - 6,92 (m, 2H), 6,80 - 6,73 (m, 4H), 6,16 (dd, J = 2,7, 16,8 Hz, 1H), 5,49 (ddd, J = 3,1, 4,3, 53,1 Hz, 1H), 4,85 - 4,75 (m, 2H), 4,63 (dd, J = 3,9, 14,8 Hz, 1H), 4,30 - 4,19 (m, 2H), 4,18 - 4,12 (m, 1H), 3,94 (tt, J = 3,5, 8,2 Hz, 1H), 3,84 (td, J = 5,5, 12,1 Hz, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,53 (dd, J = 2,7, 10,9 Hz, 1H), 3,17 (dd, J = 3,5, 10,9 Hz, 1H), 2,94 (br t, J = 5,5 Hz, 1H), 0,89 (s, 6H), 0,83 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), -0,01 (s, 3H)

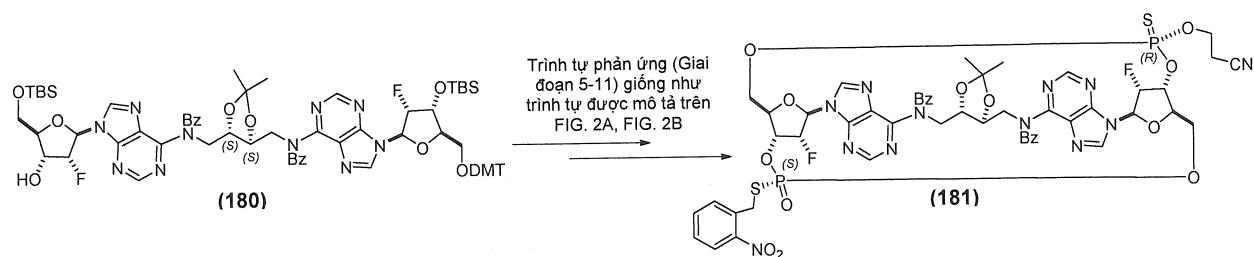
Hợp chất 180



Bổ sung triphenylphosphin (0,191 g, 0,728 mmol) và DIAD (0,142 ml, 0,728 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 178 (0,409 g, 0,84 mmol) trong THF (6mL). Sau 40 giờ khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột (SiO₂ 50g được xử lý sơ bộ bằng TEA 1% trong n-heptan/EtOAc (1/1), EtOAc 50% đến 66% trong n-heptan) để thu được 0,533 g Hợp chất 180.

LC/MS: LRMS (ESI) m/z 1403,86 [M+H]⁺.

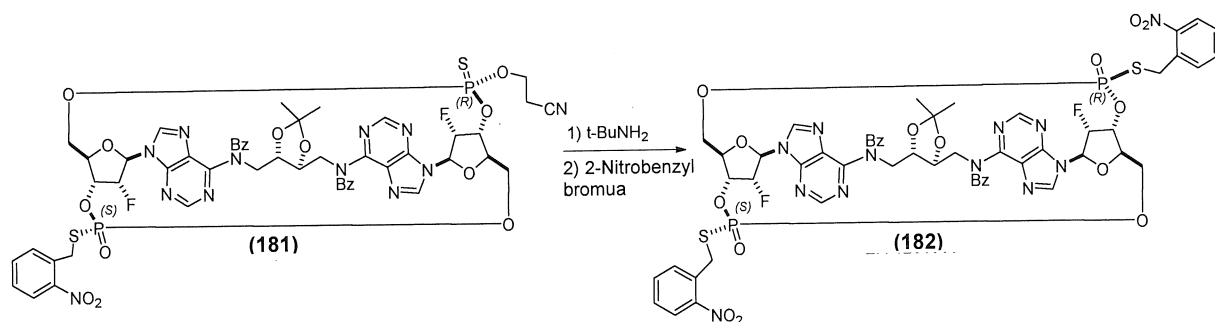
Hợp chất 181



Với Hợp chất 180 làm nguyên liệu ban đầu, Hợp chất 181 được điều chế thông qua trình tự phản ứng (Giai đoạn 5-11) giống như trình tự được mô tả trên FIG. 2A và FIG. 2B.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,72 (s, 1H), 8,14 - 8,06 (m, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,62 - 7,53 (m, 6H), 7,53 - 7,45 (m, 1H), 7,43 - 7,33 (m, 2H), 7,30 - 7,24 (m, 3H), 7,19 - 7,12 (m, 2H), 6,11 (d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,05 (d, J = 19,5 Hz, 1H), 5,89 (dd, J = 3,5, 52,3 Hz, 1H), 5,57 - 5,46 (m, 1H), 5,41 (dd, J = 3,5, 53,1 Hz, 1H), 5,18 - 5,04 (m, 1H), 4,83 (dd, J = 4,7, 14,4 Hz, 1H), 4,78 - 4,73 (m, 1H), 4,70 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,64 - 4,48 (m, 4H), 4,46 - 4,35 (m, 4H), 4,33 - 4,27 (m, 2H), 4,16 - 4,06 (m, 2H), 4,05 - 3,96 (m, 1H), 2,55 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 1,26 (s, 6H).

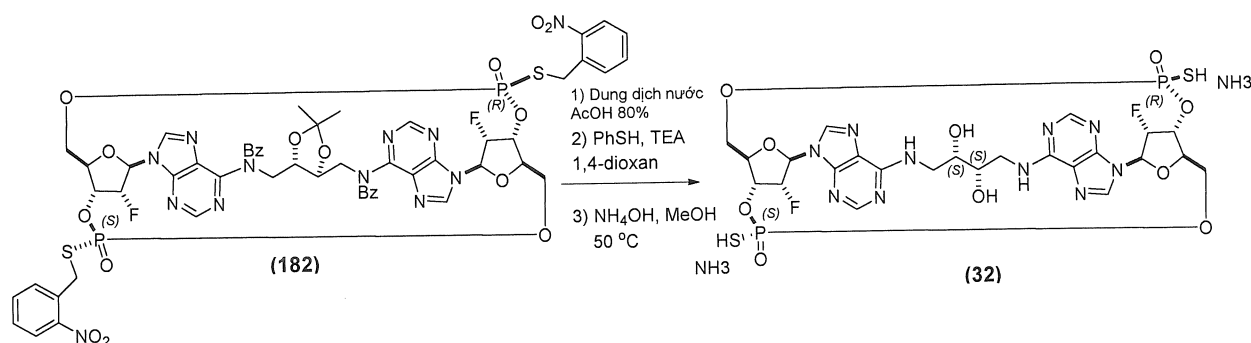
Hợp chất 182



Bổ sung tert-butylamin (0,5 ml, 4,7 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 181 (3,2 mg, 2,629 μmol) trong diclorometan (0,5 ml). Sau 30 phút khuấy, dung dịch phản ứng được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng MeCN hai lần. Phần cặn được hòa tan trong axetonitril (1 ml) và được xử lý bằng 1-(bromometyl)-2-nitrobenzen (1,7 mg, 7,9 μmol). Khi sự alkyl hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được cô bằng cách sục khí nitơ. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 4g, EtOAc 80% đến 100% trong n-heptan) thu được 2 mg Hợp chất 182.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,12 (dd, J = 1,4, 8,0 Hz, 1H), 8,03 - 8,00 (m, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,70 - 7,29 (m, 13H), 7,21 (dt, J = 2,7, 7,6 Hz, 4H), 6,07 (d, J = 19,9 Hz, 1H), 5,94(d, J = 21,1 Hz, 1H), 5,91 - 5,77 (m, 1H), 5,81 (dd, J = 4,3, 51,5 Hz, 1H), 5,62 - 5,49 (m, 1H), 5,54 (dd, J = 3,1, 52,7 Hz, 2H), 4,83 (q, J = 5,9 Hz, 1H), 4,72 - 4,63 (m, 2H), 4,61 - 4,28 (m, 13H), 1,42 (s, 3H), 1,28 (s, 3H).

Hợp chất 32



Hợp chất 182 (2,0 mg, 1,5 μmol) được bổ sung axit axetic (0,8 ml) và nước (0,2 ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 14 giờ và tại 45-50°C trong 24 giờ, được cô trong chân không, và được đun đồng sôi bằng toluen hai lần. Phần cặn được bổ sung 1,4-dioxan (0,12 mL), thiophenol (60 μl) và sau đó là TEA (60 μl). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, metanol (160 μl) và amoni hydroxit 28% (160 μl) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở 50°C khi sự khử benzol hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS). Khi hoàn thành, nước (0,3 ml) được bổ sung. Chất rắn tạo thành được lọc ra, được rửa bằng nước (0,2 mL). Chất lọc được chiết hai lần bằng toluen (0,5 mL mỗi lần) và được cô trong chân không ở 40-50°C. Phần cặn được xử lý bằng nước (0,5 mL) và chất rắn tạo thành được lọc ra, được rửa bằng nước (0,1 mL). Tinh chế HPLC các lớp nước kết hợp trong các điều kiện được mô tả dưới đây thu được 1,5 mg Hợp chất 32.

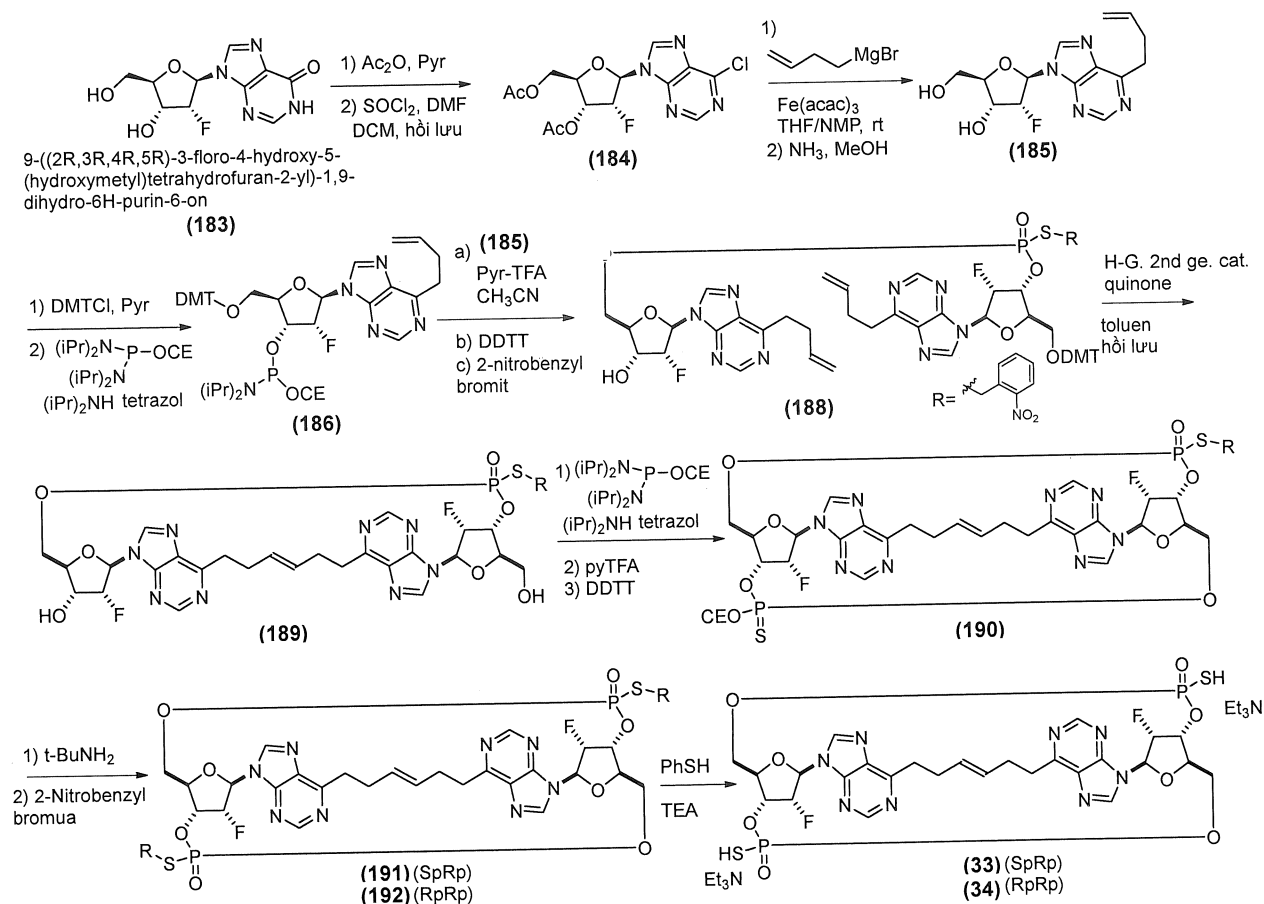
LC/MS: LRMS (ESI) m/z 781,23 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Các điều kiện HPLC điều chế cho Hợp chất 32:

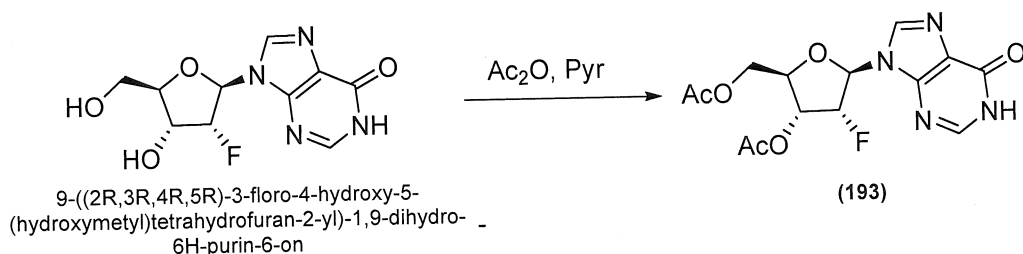
Trang thiết bị	Agilent 1200/1260 AS/FC
Cột HPLC	Xterra C18 nước, 10 x 100mm # 1414
Tốc độ dòng	3,0 ml/phút
Nhiệt độ cột	35°C

Pha động	A: NH ₄ OH 0,1% trong nước, B: NH ₄ OH 0,1% trong axetonitril
Gradient (B%)	0 → 5
Thời gian chạy	20 phút
Thể tích tiêm	50 μ l (1 mg/ml trong nước)
Phát hiện	UV 260 nm
Thời gian lưu	12,7 phút

Ví dụ 21 -- Tổng hợp Hợp chất 33 và Hợp chất 34



Hợp chất 193

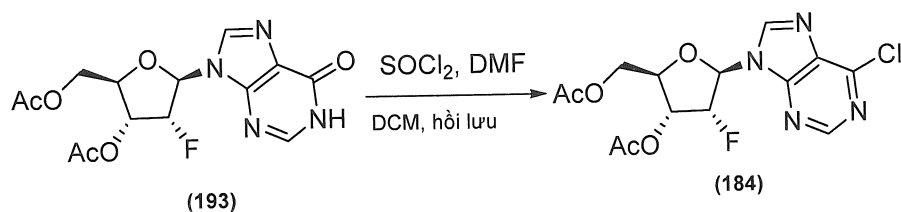


Bổ sung Ac₂O (7,0 ml, 74 mmol) và DMAP (0,565 g, 4,626 mmol) vào dung dịch chứa 9-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on, Hợp chất 183 (5,00 g, 18,5 mmol) trong pyridin (75 ml) tại 0°C. Hỗn hợp tạo thành được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được

khuấy trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được xử lý bằng EtOAc (200 mL) và nước (50 ml). Sự kết tủa xảy ra. Chất rắn tạo thành được thu gom bằng cách lọc và được rửa bằng MTBE. Làm khô trong chân không ở 40°C qua đêm thu được 5,81 g Hợp chất 193 dưới dạng chất rắn màu trắng.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 12,53 (br s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,15 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 6,37 (dd, J = 2,7, 19,1 Hz, 1H), 5,86 (ddd, J = 2,7, 5,1, 51,6 Hz, 1H), 5,62 (ddd, J = 5,5, 7,0, 16,0 Hz, 1H), 4,49 - 4,38 (m, 2H), 4,26 (dd, J = 4,7, 12,1 Hz, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,04 (s, 3H).

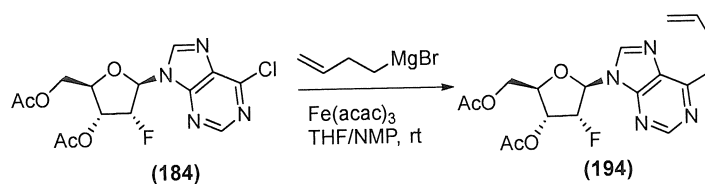
Hợp chất 184



Bổ sung từ từ DMF (1,3 ml, 16,9 mmol) và thionyl clorua (1,28 ml, 17,5 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 193 trong diclorometan (40,0 ml) tại 0°C. Hỗn hợp tạo thành được đun hồi lưu và MeOH 5% đến 10% tất cả nguyên liệu ban đầu được sử dụng (được theo dõi bằng LCMS). Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được xử lý bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (40 mL). Các lớp được tách và lớp nước được chiết hai lần bằng diclorometan (30 mL mỗi lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không để thu được 2,81 g Hợp chất 184 dưới dạng dầu màu nâu nhạt.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,79 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 6,29 (dd, J = 2,0, 18,0 Hz, 1H), 5,79 (ddd, J = 1,6, 4,7, 51,6 Hz, 1H), 5,53 (ddd, J = 5,1, 7,6, 17,8 Hz, 1H), 4,58 - 4,48 (m, 2H), 4,33 (dd, J = 3,9, 12,5 Hz, 1H), 2,20 (s, 3H), 2,07 (s, 3H).

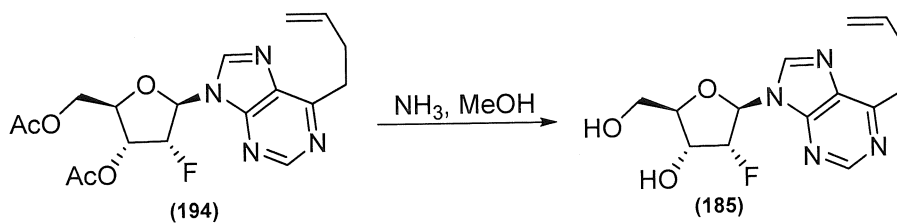
Hợp chất 194



Bổ sung sắt(III) axetylaxetonat (0,021 g, 0,059 mmol) và 3-butenylmagie bromua 0,5M (1,77 ml, 0,885 mmol) trong THF vào dung dịch chứa Hợp chất 184 (0,22 g, 0,59 mmol) trong hỗn hợp chứa THF (7,7 ml) và NMP (0,77 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi hoàn thành phản ứng (được theo dõi bằng LCMS), MTBE (10 mL) và HCl 0,1 N (10 mL) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 10 phút. Các lớp được phân tách và lớp nước được chiết bằng hỗn hợp chứa EtOAc/MTBE (1/1, 10 ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (5 ml), được làm khô trên MgSO_4 và được cô trong chân không. Sản phẩm thô được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,90 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 6,26 (dd, J = 2,0, 18,4 Hz, 1H), 5,98 - 5,85 (m, 1H), 5,90 - 5,73 (m, 1H), 5,63 (ddd, J = 4,9, 7,5, 17,7 Hz, 1H), 5,12 - 5,05 (m, 1H), 4,98 (dd, J = 1,6, 10,2 Hz, 1H), 4,54 - 4,50 (m, 2H), 4,31 (dd, J = 5,1, 12,9 Hz, 1H), 3,30 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,70 - 2,64 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,05 (s, 3H).

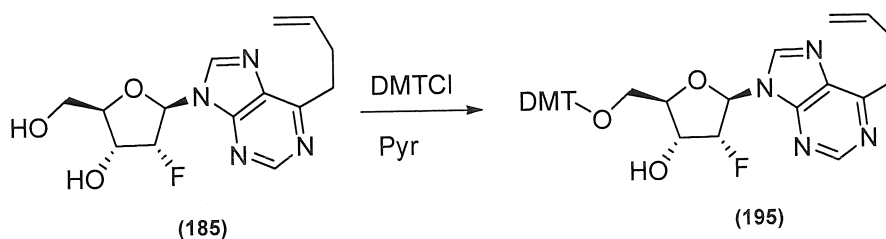
Hợp chất 185



Sản phẩm thô Hợp chất 194 (0,232 g, 0,590 mmol theo lý thuyết) được hòa tan trong metanol (1,5 ml) và được xử lý bằng amoniac 2,0 M (1,5 ml, 3,0 mmol) trong MeOH ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi khử axetyl hóa hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 10g, MeOH 0% đến 5% trong EtOAc) để thu được 0,17g Hợp chất 185.

LCMS: MS (ESI) m/z 309,20 $[\text{M}+\text{H}]^+$

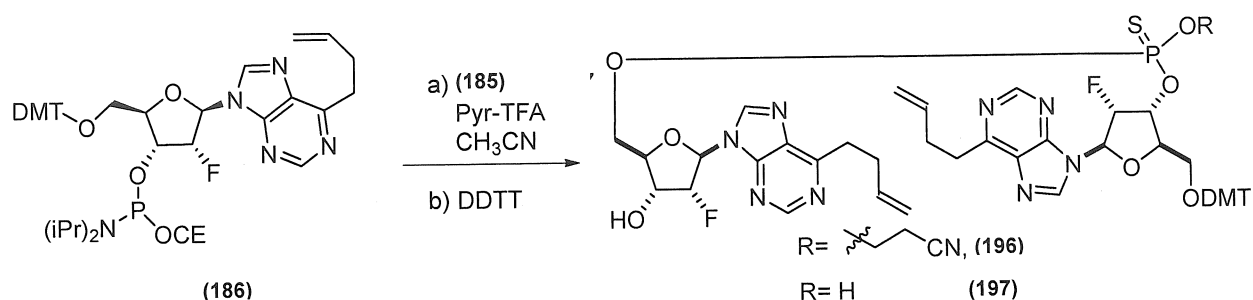
Hợp chất 195



¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,86 - 8,78 (m, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,40 - 7,36 (m, 2H), 7,31 - 7,18 (m, 7H), 6,79 (d, *J* = 8,6 Hz, 4H), 6,29 (dd, *J* = 2,3, 17,2 Hz, 1H), 5,92 (tdd, *J* = 6,4, 10,4, 17,0 Hz, 1H), 5,70 (ddd, *J* = 2,7, 4,7, 52,8 Hz, 1H), 5,09 (dd, *J* = 1,6, 17,2 Hz, 1H), 4,97 (dd, *J* = 1,6, 10,2 Hz, 1H), 4,90 - 4,77 (m, 1H), 4,26 - 4,19 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,56 (dd, *J* = 3,1, 10,9 Hz, 1H), 3,43 (dd, *J* = 4,3, 10,9 Hz, 1H), 3,33 - 3,28 (m, 2H), 2,70 - 2,64 (m, 2H), 2,20 (dd, *J* = 2,5, 7,2 Hz, 1H).

125

Hợp chất 196 và 197

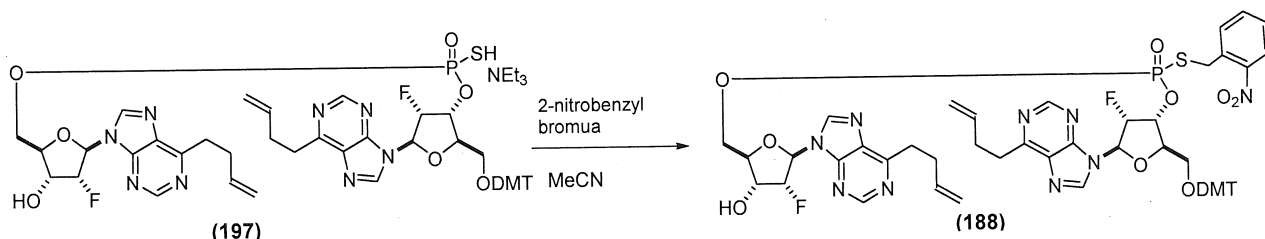


Hợp chất 186 (1,8 g, 2,22 mmol) và Hợp chất 185 (1,110 g, 2,664 mmol) được hòa tan trong axetonitril (21,6 ml) và được cô trong chân không. Công đoạn tương tự được lặp lại thêm một lần nữa. Hỗn hợp tạo thành được hòa tan trong axetonitril (21,6 ml) và được xử lý bằng pyridin trifloroaxetat (0,514 g, 2,664 mmol) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), ((dimethylamino-metyliden)amino)-3H-1,2,4-dithiazaoline-3-thion (0,911 g, 4,439 mmol) được bổ sung và hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi lưu hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (30 ml) được bổ sung và hỗn hợp tạo thành được chiết ba lần bằng MTBE (30 mL mỗi lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (20 ml), được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được cô trong chân không. Tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂ 100g, MeOH 0% đến 10% trong EtOAc với TEA 1%) thu được 0,481 g Hợp chất 196 và 1,315 g Hợp chất 197.

Hợp chất 196: LCMS: MS (ESI) m/z 1073,25 [M+Na]⁺

Hợp chất 197: LCMS: MS (ESI) m/z 995,23 [M-H]⁻

Hợp chất 188

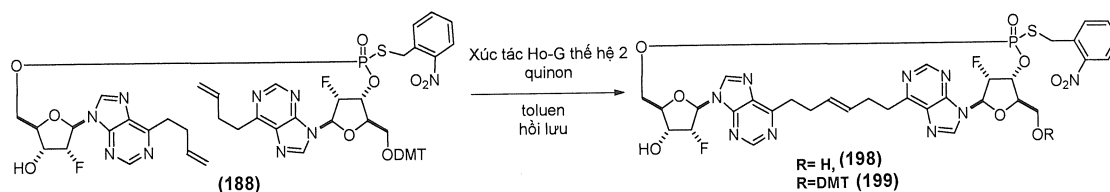


Bổ sung 2-nitrobenzyl bromua (0,388 g, 1,796 mmol) vào dung dịch chứa muối TEA Hợp chất 197 (1,315 g, 1,197 mmol) trong MeCN (20 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được

cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 100g, MeOH 0% đến 5% trong EtOAC) để thu được 0,90 g Hợp chất 188.

LCMS: MS (ESI) m/z 1154,29 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Hợp chất 198

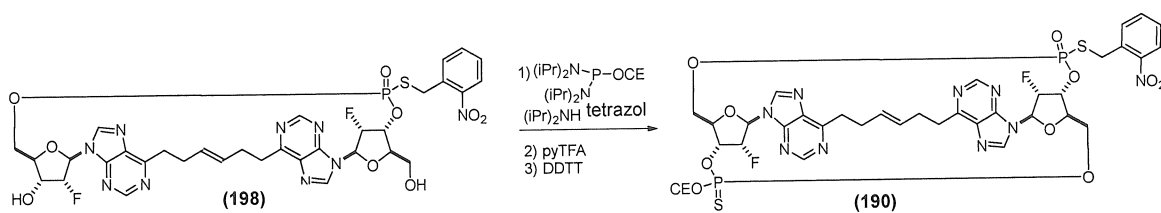


Bổ sung dung dịch chứa chất xúc tác thế hệ thứ hai Hoveyda-Grubbs (0,187 g, 0,298 mmol) và quinon (0,322 g, 2,981 mmol) trong toluen (20 mL) vào dung dịch chứa Hợp chất 188 (1,35 g, 1,192 mmol) trong toluen (540 mL) tại hồi lưu nhẹ (nhiệt độ bên trong 110-112°C). Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 110 đến 112°C trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Sau 4 giờ, chất xúc tác bổ sung (0,10 g, 0,16 mmol) được bổ sung và khuấy liên tục tại hồi lưu. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh và được xử lý bằng DMSO (2,54 mL, 35,8 mmol). Sau 3 giờ khuấy, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 50g, MeOH 0% đến 15% trong EtOAC) để thu được hỗn hợp chứa Hợp chất 198 và Hợp chất 199. Hỗn hợp này được hòa tan trong diclorometan (2 mL) và được xử lý bằng nước (0,021 mL, 1,2 mmol) và axit dicloroacetic 6% (0,098 mL, 1,2 mmol) trong diclorometan (2 mL). Sau 10 phút, phản ứng được ngừng bằng pyridin (1 mL) và được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong diclorometan (50 mL) và được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (15 mL mỗi lần) hai lần và được làm khô trên MgSO_4 . Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 50g, MeOH 5% đến 10% trong DCM) thu được 0,25 g Hợp chất 198.

Hợp chất 199:LCMS: MS (ESI) m/z 1104,31 $[\text{M}+\text{H}]^+$

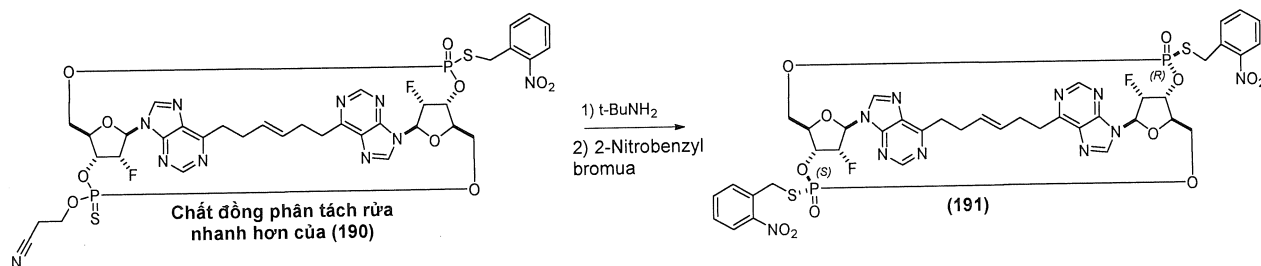
Hợp chất 198:LCMS: MS (ESI) m/z 802,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Hợp chất 190



Hợp chất 198 (0,233 g, 0,291 mmol) và 3-(Bis(diisopropylamino)phosphinoxy)propanenitril (0,111 ml, 0,349 mmol) được hòa tan trong MeCN (10 mL) và được cô trong chân không. Công đoạn tương tự được lặp lại thêm hai lần nữa. Hỗn hợp tạo thành được hòa tan trong diclorometan (2,3 ml), được làm mát đến 0-5°C, và được xử lý bằng diisopropylamoni tetrazolit (0,025 g, 0,145 mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm và sau đó được hòa tan bằng axetonitril (2,3 ml). Dung dịch tạo thành được bổ sung trong 7 giờ qua bơm tiêm vào dung dịch muối pyridin trifloroaxetat (0,168 g, 0,872 mmol) trong MeCN (18,6 ml). 3-(Bis(diisopropylamino)phosphinoxy)propanenitril (40 mg, 0,133 mmol) trong MeCN (2 mL) sau đó được bổ sung trong 2 giờ. Sau 1 giờ khuấy, (E)-N,N-dimetyl-N'-(3-thioxo-3H-1,2,4-dithiazol-5-yl)formimidamit (0,119 g, 0,581 mmol) được bổ sung và dung dịch phản ứng MeOH 5% đến 10% sự lưu hóa hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS). Khi hoàn thành, hỗn hợp này được cô trong chân không, được hòa tan trong MTBE (5 ml), và được xử lý bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (3,50 ml) và nước (1,2 ml). Các lớp này được phân tách và lớp nước được chiết bằng hỗn hợp chứa MTBE/EtOAc (5/3 ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa hai lần bằng dung dịch nước NaCl 30% (2,3 ml), được làm khô trên MgSO₄, được lọc, và được cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột silicagel (SiO₂ 25g, MeOH 0% đến 20% trong EtOAc) thu được 119 mg Hợp chất 190 (58 mg các chất đồng phân tách rửa nhanh hơn và 61 mg các chất đồng phân tách rửa chậm hơn).

Hợp chất 191 (chất đồng phân SpRp)

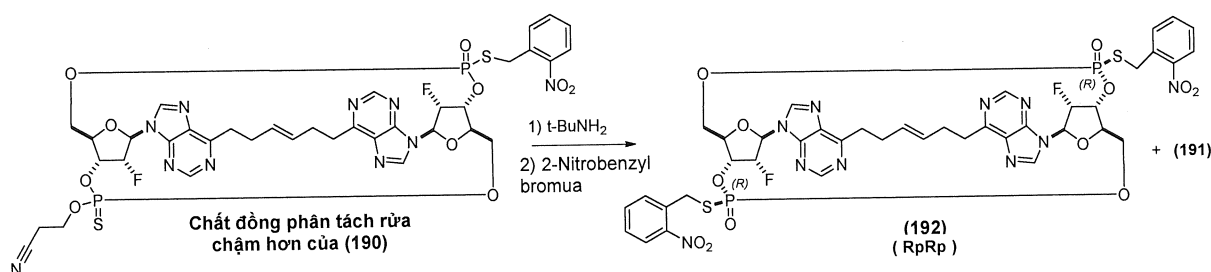


Bổ sung tert-butylamin (1,2 ml, 11 mmol) vào dung dịch chứa các chất đồng phân tách rửa nhanh hơn của Hợp chất 190 (58 mg, 0,062 mmol) trong diclorometan (1,8

mL). Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh tới khi tất cả nguyên liệu ban đầu được sử dụng (được theo dõi bằng LCMS). Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không, được đun đồng sôi bằng axetonitril hai lần, và được hòa tan trong axetonitril (1,7 ml). Dung dịch tạo thành được bổ sung 1-(bromometyl)-2-nitrobenzen (40,3 mg, 0,187 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng này được theo dõi bằng LCMS. Sau khi sự alkyl hóa hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 10g, MeOH 0% đến 5% trong EtOAc) để thu được 19 mg Hợp chất 191 (chất đồng phân SpRp).

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,42 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,13 (dd, J = 1,2, 8,2 Hz, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,98 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,69 - 7,67 (m, 1H), 7,61 - 7,34 (m, 5H), 6,33 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 6,19 (d, J = 19,9 Hz, 1H), 6,09 - 5,93 (m, 1H), 5,82 - 5,66 (m, 2H), 5,67 (dd, J = 3,5, 50,8 Hz, 1H), 5,35 - 5,32 (m, 2H), 4,62 - 4,29 (m, 11H), 3,35 - 3,28 (m, 1H), 3,18 - 3,14 (m, 2H), 3,01 - 2,91 (m, 1H), 2,84 - 2,78 (m, 1H), 2,60 - 2,49 (m, 3H).

Hợp chất Hợp chất 192 (chất đồng phân RpRp)



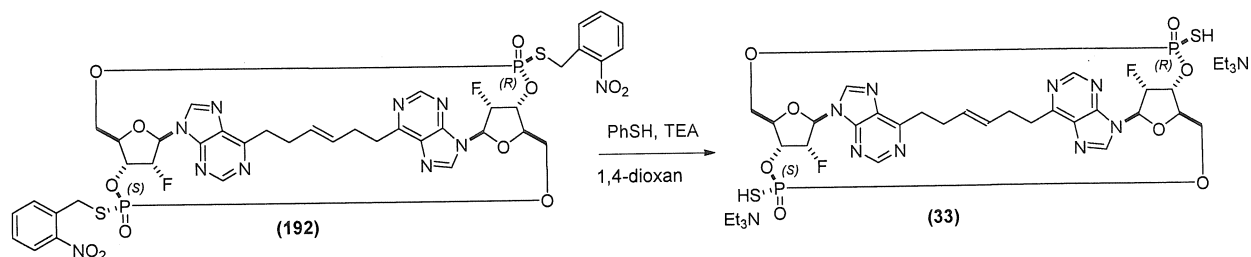
Chất đồng phân tách rửa chậm hơn của Hợp chất 190 (60 mg) được xử lý thông qua các trình tự phản ứng giống như các trình tự được mô tả trong Hợp chất 191 để thu được 14 mg Hợp chất 192 và 7 mg Hợp chất 191.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,18 (s, 2H), 8,10 (s, 2H), 8,10 (dd, J = 1,0, 8,0 Hz, 2H), 7,66 - 7,57 (m, 4H), 7,53 - 7,46 (m, 2H), 6,31 (d, J = 17,6 Hz, 2H), 6,19 - 6,05 (m, 2H), 5,84 (dd, J = 4,3, 50,8 Hz, 2H), 5,39 - 5,30 (m, 2H), 4,58 - 4,46 (m, 6H), 4,45 - 4,39 (m, 2H), 4,19 (ddd, J = 3,1, 6,3, 10,2 Hz, 2H), 3,32 (td, J = 3,5, 15,6 Hz, 2H), 3,06 (td, J = 6,3, 15,2 Hz, 2H), 2,67 - 2,57 (m, 4H).

Dựa vào phương pháp tổng hợp, số liệu NMR (đối xứng), thời gian giữ HPLC (chất đồng phân tách rửa chậm nhất) và các hoạt tính sinh học của Hợp chất 34, mà được

thu từ Hợp chất 192, Chủ đơn tin rằng Hợp chất 192 có hóa học lập thể phospho RR. Sự thiết lập hóa học lập thể sẽ được xác nhận bằng tinh thể học tia X

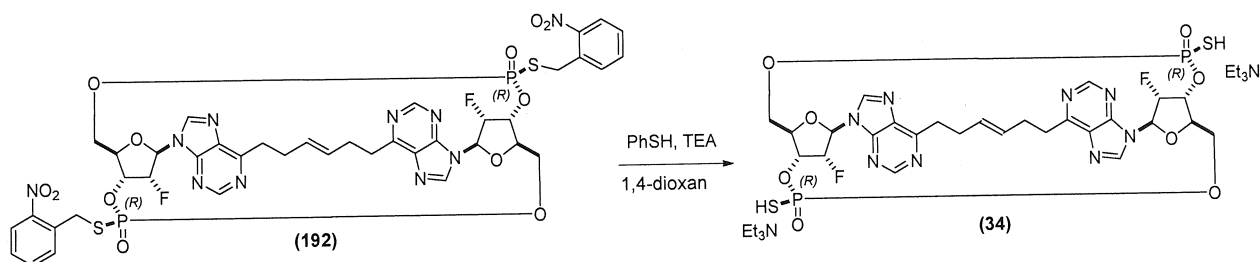
Hợp chất 33



Bổ sung thiophenol (0,26 ml, 2,5 mmol) và sau đó là TEA (0,26 ml, 1,9 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 192 (26 mg, 0,026 mmol) trong 1,4-dioxan (0,52 ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh tới khi sự khử bảo vệ hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS). Khi hoàn thành, nước (2mL) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được chiết ba lần bằng toluen (2 mL mỗi lần). Lọc nước được cô trong chân không ở 40-50°C và được hòa tan trong nước (2 mL). Hỗn hợp tạo thành được chiết bốn lần bằng hỗn hợp chứa EtOAc/MTBE (1/1mL mỗi lần). Lọc nước được cô trong chân không để thu được muối bis-TEA của Hợp chất 33.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,06 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 6,43 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 6,27 (dd, J = 3,5, 51,1 Hz, 1H), 5,63 (dd, J = 2,7, 51,5 Hz, 1H), 5,30 - 5,14 (m, 2H), 5,06 - 4,91 (m, 2H), 4,58 (br d, J = 12,5 Hz, 1H), 4,52 - 4,39 (m, 3H), 4,07 (dd, J = 4,7, 11,7 Hz, 1H), 3,98 (dd, J = 5,1, 12,5 Hz, 1H), 3,43 - 3,34 (m, 2H), 3,22 (q, J = 7,2 Hz, 12H), 2,98 - 2,86 (m, 2H), 2,79 - 2,45 (m, 4H), 1,32 (t, J = 7,4 Hz, 18H)

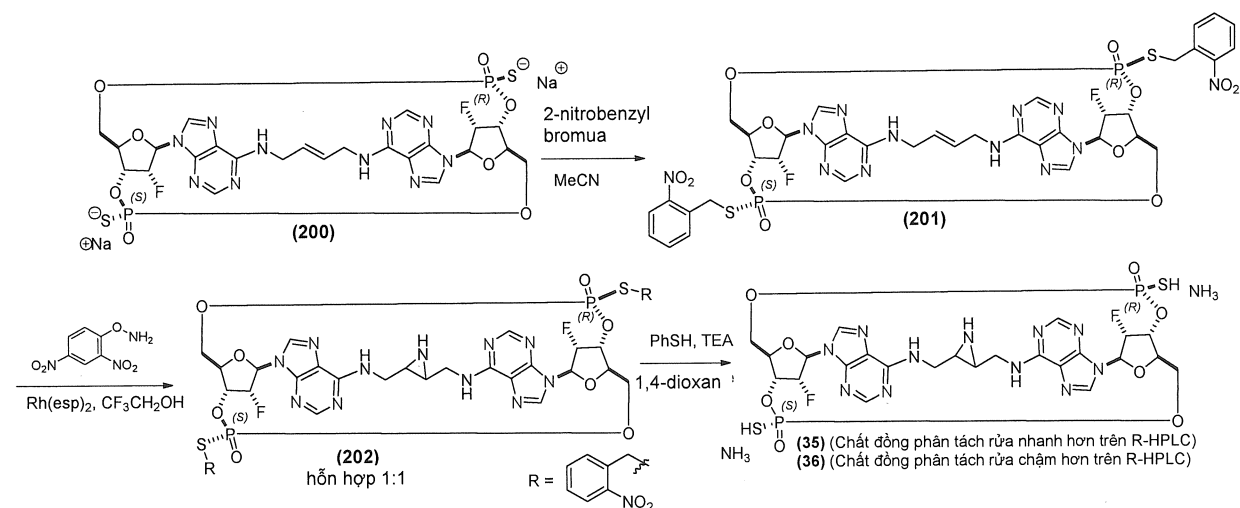
Hợp chất 34



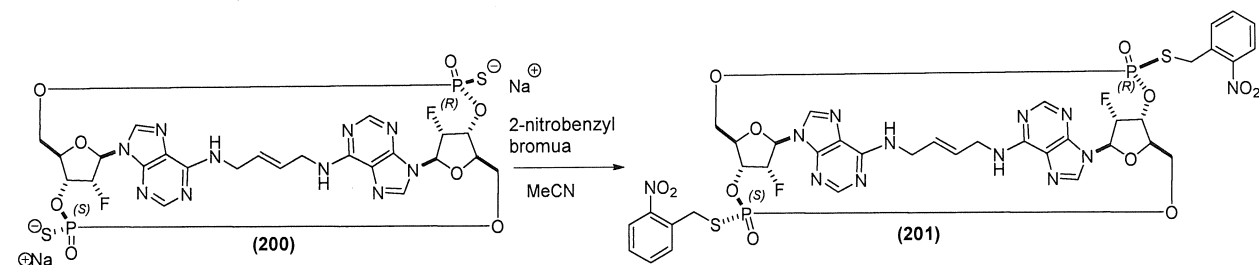
Với Hợp chất 192 làm nguyên liệu ban đầu, Hợp chất 34 được điều chế thông qua các trình tự phản ứng giống như các trình tự được mô tả trong Hợp chất 33.

^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,77 (s, 2H), 8,49 (s, 2H), 6,39 (d, J = 15,2 Hz, 2H), 5,71 (dd, J = 3,1, 51,2 Hz, 2H), 5,24 - 5,13 (m, 2H), 5,02 (dtd, J = 3,1, 9,0, 25,4 Hz, 2H), 4,54 (br d, J = 12,1 Hz, 2H), 4,42 (br d, J = 9,8 Hz, 2H), 3,99 (dd, J = 5,9, 12,1 Hz, 2H), 3,20 (q, J = 7,3 Hz, 12H), 2,90 (ddd, J = 3,5, 10,2, 14,1 Hz, 2H), 2,81 - 2,70 (m, 2H), 2,55 - 2,43 (m, 2H), 1,30 (t, J = 7,4 Hz, 18H).

Ví dụ 22 -- Tổng hợp Hợp chất 35 và Hợp chất 36



Hợp chất 201

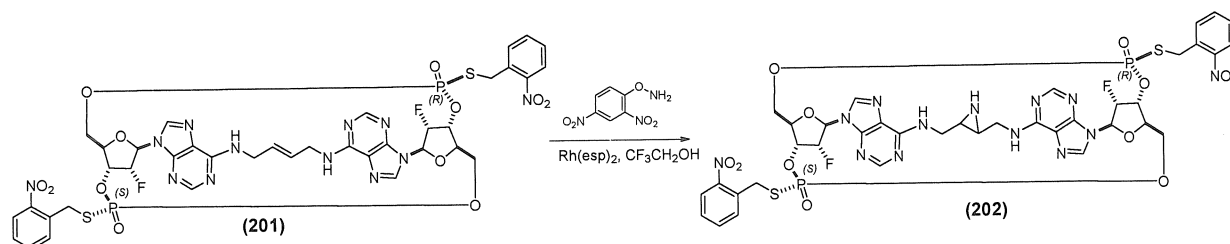


Bổ sung 2-nitrobenzyl bromua (0,068 g, 0,316 mmol) và MeCN (2,0 ml) vào muối di-natri của Hợp chất 200 (0,10 g, 0,126 mmol). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 10g, MeOH 0% đến 5% trong DCM) để thu được 115 mg Hợp chất 201.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,13 (dd, J = 0,8, 8,2 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,03 (dd, J = 1,0, 8,0 Hz, 1H), 7,80 (br s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,70 - 7,65 (m, 1H), 7,62 - 7,54 (m, 2H), 7,53 - 7,47 (m, 2H), 7,45 - 7,39 (m, 1H), 7,34 - 7,27 (m, 1H), 6,23 (br d, J = 16,8 Hz, 1H), 6,14 (br d, J = 18,8 Hz, 1H), 5,95 (br s, 2H), 5,77 (td, J = 5,1, 15,2

Hz, 2H), 5,71 (td, $J = 5,1, 15,6$ Hz, 1H), 5,63 - 5,55 (m, 1H), 5,47 (br d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 4,58 - 4,27 (m, 11H), 4,18 - 4,10 (m, 1H), 4,05 - 3,71 (m, 2H)

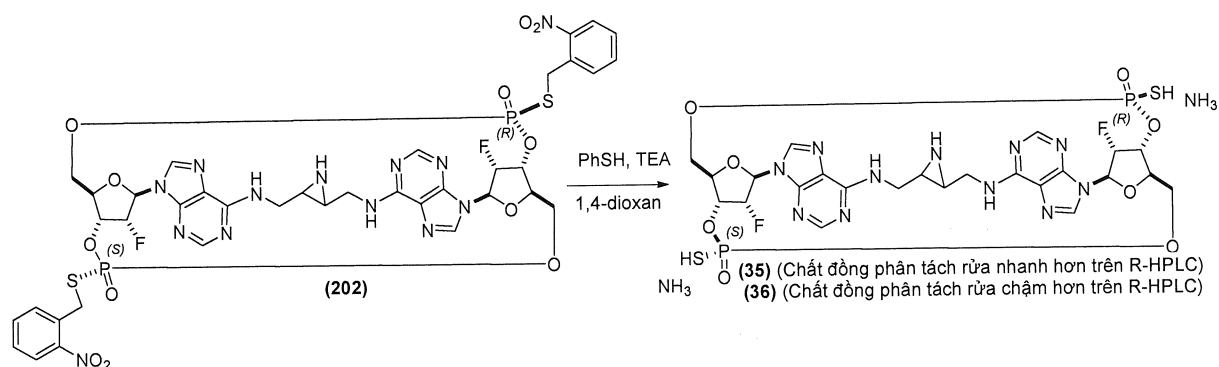
Hợp chất 202



Dung dịch chứa Hợp chất 201 (77 mg, 0,076 mmol) trong 2,2,2-trifloroethanol (2 ml) được bổ sung O-(2,4-dinitrophenyl)hydroxylamin (36,5 mg, 0,183 mmol) và bis[rhodium(axit $\alpha,\alpha',\alpha',\alpha'$ -tetrametyl-1,3-benzenedipropionic)] (5,74 mg, 0,015 mmol) trong một phần. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh qua đêm, được hòa tan bằng DCM (10 mL) và được xử lý bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (10 mL). Các lớp được phân tách và lớp nước được chiết hai lần bằng DCM (10 mL mỗi lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên MgSO_4 và được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel (SiO_2 10g, MeOH 0% đến 15% trong EtOAc) để thu được 3,3 mg Hợp chất 202.

LCMS: MS m/z 1032,07 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Hợp chất 35 và Hợp chất 36



Bổ sung thiophenol (0,2 ml, 1,9 mmol) và TEA (0,2 ml, 1,4 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 202 (3,3 mg, 3,2 μmol) trong 1,4-dioxan (0,40 ml). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được xử lý bằng nước (2mL) và được chiết ba lần bằng toluen (2 mL mỗi lần). Lớp nước được cô trong chân không ở 40-50°C và được hòa tan trong nước (1,5 ml). Chất rắn tạo thành được lọc ra, được rửa bằng nước

(0,5 mL). Sự phân tách HPLC của các chất lọc kết hợp trong các điều kiện được mô tả dưới đây thu được Hợp chất 35 (thời gian lưu: 8,4 phút) và Hợp chất 36 (thời gian lưu: 8,9 phút)

Hợp chất 35

LCMS: MS m/z 762,08 $[M+H]^+$

Hợp chất 36

LCMS: MS m/z 762,22 $[M+H]^+$

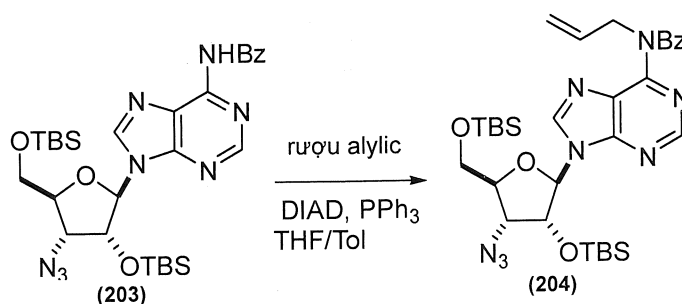
Các điều kiện HPLC điều chế của Hợp chất 35/Hợp chất 36:

Trang thiết bị		Agilent 1200/1260 AS/FC
Cột HPLC		Xterra C18 nước, 10 x 100mm # 3128
Tốc độ dòng		3,0 ml/phút
Nhiệt độ cột		35°C
Pha động		A: Axit formic 0,1% trong nước, B: Axit formic 0,1% trong axetonitril
Gradient (B%)		0 → 50
Thời gian chạy		20 phút
Thể tích tiêm		50 μ l (1 mg/ml trong nước)
Phát hiện		UV 260 nm
Thời gian lưu	Hợp chất 35	8,4 phút
	Hợp chất 36	8,9 phút

Ví dụ - 23 -- Tổng hợp Hợp chất 38 và Hợp chất 39

FIG. 13 thể hiện ví dụ về quy trình tổng hợp Hợp chất 38 và Hợp chất 39.

Bước 1

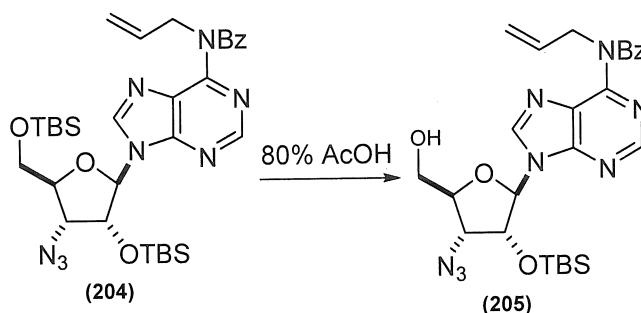


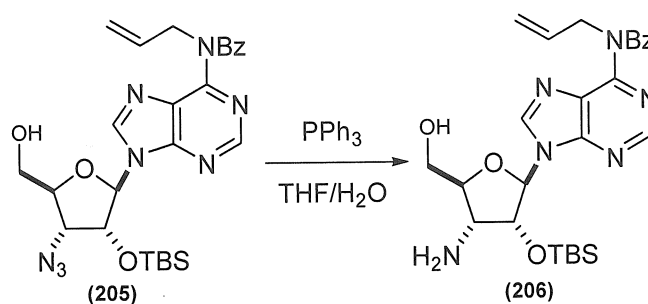
Bổ sung dung dịch chứa DIAD (2,4 ml, 11,6 mmol) và triphenylphosphin (2,93 g, 11,2 mmol) trong toluen (25 ml) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 10°C vào dung dịch chứa Hợp chất 203 (5,82 g, 9,314 mmol) và rượu allylic (0,95 ml, 14 mmol) trong THF (50 mL) ở 0°C. Dung dịch tạo thành được làm ấm đến nhiệt độ môi trường xung

quanh và được khuấy trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (5 giờ), hỗn hợp này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (100 g, EtOAc 20% đến 60% trong n-heptan) để thu được 4,56 g Hợp chất 204 dưới dạng dầu màu hồng nhạt.

Hợp chất 204: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,55 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,46 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,31 - 7,23 (m, 1H), 7,20 - 7,10 (m, 2H), 6,02 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 6,07 - 5,95 (m, 1H), 5,21 (dd, J = 1,6, 17,2 Hz, 1H), 5,05 (dd, J = 1,4, 10,4 Hz, 1H), 5,00 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 4,82 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 4,22 - 4,16 (m, 1H), 4,05 - 4,00 (m, 2H), 3,82 (dd, J = 2,5, 11,5 Hz, 1H), 0,95 (s, 9H), 0,81 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,13 (s, 3H), 0,00 (s, 3H), -0,23 (s, 3H).

Bước 2

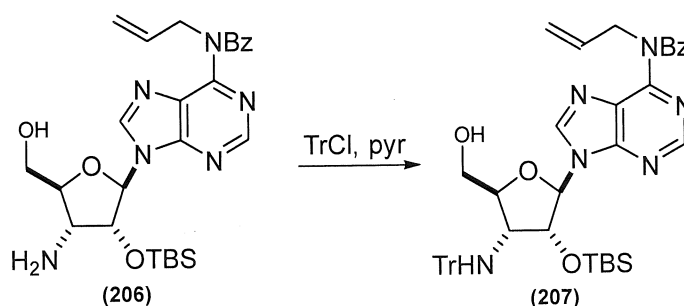




Bổ sung nước (30 ml) và triphenylphosphin (2,454 g, 9,355 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 205 (3,22 g, 5,847 mmol) trong THF (120 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (18 giờ), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không và được đun đồng sôi bằng MeCN ba lần. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 (NH) 55g, EtOAc 20% đến 100% trong n-heptan) để thu được 4,82 g Hợp chất 206 (độ tinh khiết giả định 63%). Sản phẩm này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Hợp chất 206: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,56 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,54 (qd, J = 1,6, 7,6 Hz, 2H), 7,31 - 7,27 (m, 1H), 7,19 - 7,15 (m, 2H), 6,07 - 5,94 (m, 1H), 5,84 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,50 (br d, J = 10,6 Hz, 1H), 5,20 (dd, J = 1,6, 17,2 Hz, 1H), 5,05 (dd, J = 1,4, 10,4 Hz, 1H), 5,02 - 4,98 (m, 2H), 4,95 - 4,91 (m, 1H), 4,16 - 4,08 (m, 2H), 3,96 (dd, J = 1,6, 12,9 Hz, 1H), 3,73 (dd, J = 2,0, 5,5 Hz, 1H), 3,73 - 3,67 (m, 1H), 0,78 (s, 9H), -0,20 (s, 3H), -0,46 (s, 3H).

Bước 4

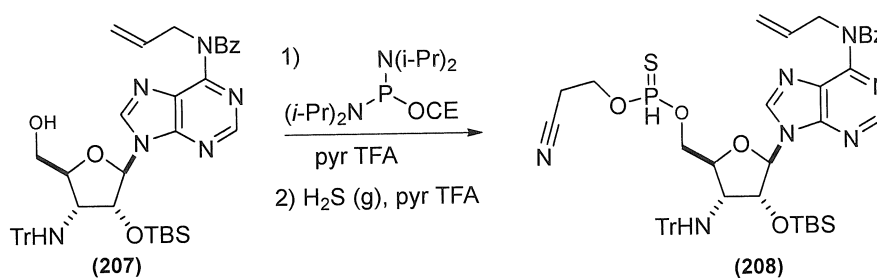


Bổ sung TEA (1,3 ml, 8,6 mmol) và trityl-Cl (1,753 g, 6,289 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 206 (4,82g, độ tinh khiết 63%, 5,72 mmol) trong pyridin (39,0 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi phản ứng hoàn thành (được theo dõi bằng LC/MS), dung dịch NaHCO_3 bão hòa (60 mL) được bổ sung. Hỗn hợp tạo thành được chiết ba lần bằng hỗn hợp chứa MTBE/EtOAc (1/1, 70 mL mỗi lần). Các lớp hữu cơ kết

hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (30 ml), và được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 50g được xử lý sơ bộ bằng TEA 1% trong EtOAc/n-heptan, EtOAc 20% đến 100% trong n-heptan với TEA 1%) để thu được 1,484 g Hợp chất 207 dưới dạng chất rắn màu trắng.

Hợp chất 207: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,49 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,50 - 7,46 (m, 8H), 7,31 - 7,22 (m, 7H), 7,20 - 7,14 (m, 5H), 6,11 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 6,07 - 5,94 (m, 1H), 5,20 (dd, J = 1,2, 17,2 Hz, 1H), 5,06 (dd, J = 1,4, 10,4 Hz, 1H), 5,03 - 4,98 (m, 2H), 4,84 (dd, J = 3,1, 10,6 Hz, 1H), 4,52 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 3,78 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 3,64 - 3,57 (m, 1H), 3,26 - 3,16 (m, 3H), 0,77 (s, 9H), -0,18 (s, 3H), -0,63 (s, 3H).

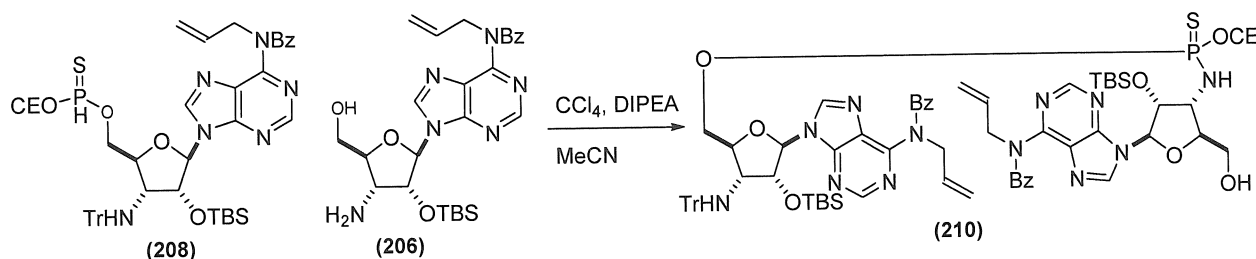
Bước 5



Bổ sung 3-((bis(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propanenitril (0,393 g, 1,304 mmol) và pyridin trifloroaxetat (0,113 g, 0,587 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 207 (0,50 g, 0,652 mmol) trong MeCN (6 mL) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (1 giờ), dung dịch tạo thành được xử lý bằng khí hydro sulfua (bọt tắm) trong 1 phút, tiếp theo là pyridin trifloroaxetat (0,252 g, 1,304 mmol). Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (1 giờ), hỗn hợp tạo thành được hòa tan bằng MTBE (60 mL). Dung dịch tạo thành được rửa bằng nước (15 mL mỗi lần) hai lần và dung dịch nước NaCl 30% (15 ml), và được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 25g, EtOAc 25% đến 40% trong n-heptan) để thu được 0,411 g Hợp chất 208 (hỗn hợp không đối quang P 1:1) dưới dạng chất rắn bọt màu trắng.

Hợp chất 208 (hỗn hợp không đối quang P 1:1) ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,49 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,54 - 7,47 (m, 4H), 7,46 - 7,38 (m, 14H), 7,32 - 7,27 (m, 2H), 7,23 - 7,04 (m, 20H), 6,11 - 5,99 (m, 2H), 5,98 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 5,91 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 5,27 (dd, J = 1,6, 6,3 Hz, 1H), 5,23 (dd, J = 1,6, 6,3 Hz, 1H), 5,12 (dd, J = 1,6, 6,3 Hz, 1H), 5,09 (dd, J = 1,2, 6,3 Hz, 1H), 5,02 (br d, J = 5,5 Hz, 4H), 4,57 - 4,45 (m, 2H), 4,43 - 4,34 (m, 1H), 4,32 - 4,04 (m, 8H), 3,23 - 3,19 (m, 1H), 3,10 (br s, 2H), 3,06 - 2,99 (m, 1H), 2,96 - 2,89 (m, 2H), 2,73 (dt, J = 1,4, 6,4 Hz, 2H), 2,65 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 0,85 (s, 9H), 0,83 (s, 9H), 0,01 (s, 3H), -0,09 (s, 6H), -0,11 (s, 3H).

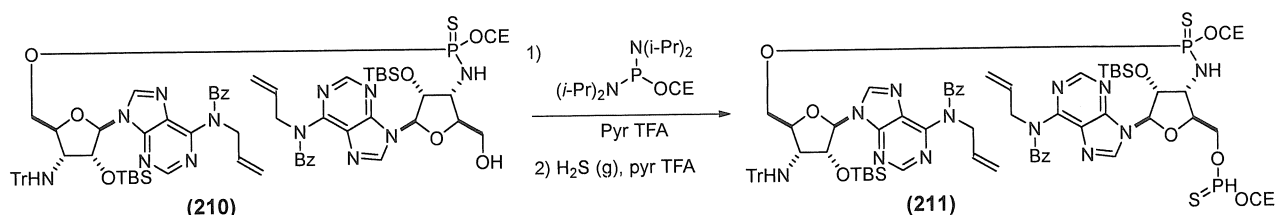
Bước 6



Bổ sung DIEA (0,16 ml, 0,91 mmol) và CCl₄ (0,18 ml, 1,8 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 208 (0,411 g, 0,457 mmol) và Hợp chất 206 (0,293 g, 0,502 mmol) trong axetonitril (5 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (1 giờ), hỗn hợp tạo thành được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO₂ 25g, EtOAc 33% đến 100% trong n-heptan) để thu được 0,461g Hợp chất 210 (hỗn hợp không đối quang P 1:1) dưới dạng chất rắn bột màu trắng.

Hợp chất 210: ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 8,52 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,55 - 7,37 (m, 20H), 7,33 - 6,99 (m, 30H), 6,09 - 5,97 (m, 4H), 5,96 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,87 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 5,82 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 5,80 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 5,28 - 5,17 (m, 4H), 5,11 - 5,04 (m, 4H), 5,03 - 4,96 (m, 8H), 4,75 (t, J = 5,1 Hz, 1H), 4,70 (t, J = 4,5 Hz, 1H), 4,46 - 4,33 (m, 3H), 4,31 - 4,18 (m, 5H), 4,12 - 3,96 (m, 8H), 3,89 (br d, J = 11,7 Hz, 1H), 3,78 - 3,67 (m, 3H), 3,57 (dd, J = 2,9, 4,1 Hz, 1H), 3,56 - 3,44 (m, 2H), 3,08 - 3,01 (m, 2H), 2,99 - 2,93 (m, 1H), 2,91 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 2,77 - 2,73 (m, 1H), 2,72 - 2,53 (m, 4H), 0,84 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,84 (s, 9H), 0,82 (s, 9H), 0,00 (s, 3H), -0,05 (s, 6H), -0,08 (s, 3H), -0,12 (s, 3H), -0,15 (s, 3H), -0,18 (s, 3H), -0,18 (s, 3H).

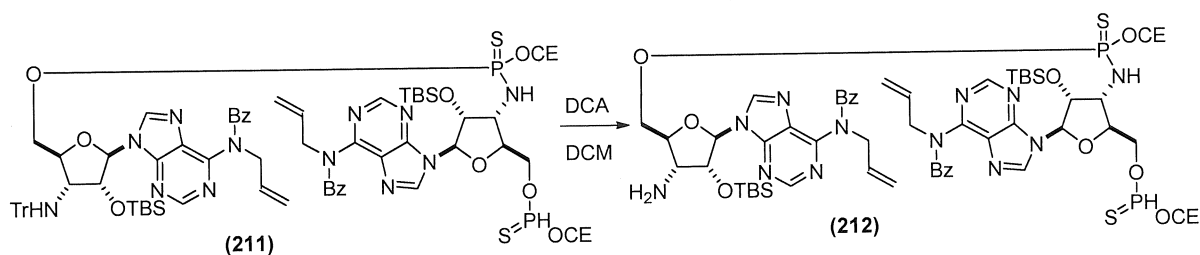
Bước 7



Bổ sung 3-((bis(diisopropylamino)phosphaneyl)oxy)propanenitril (0,195 g, 0,648 mmol) và pyridin trifloroaxetat (0,050 g, 0,259 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 210 (0,461 g, 0,324 mmol) trong MeCN (5,5 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (40 phút), dung dịch tạo thành được sủi bọt bằng khí hydro sulfua trong 1 phút và sau đó được xử lý bằng pyridin trifloroaxetat (0,138 g, 0,713 mmol). Khi hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), dung dịch tạo thành được hòa tan bằng MTBE (30 mL), được rửa bằng nước (10 mL mỗi lần) hai lần và dung dịch nước NaCl 30% (10 ml), được làm khô trên Na_2SO_4 , được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO_2 25 g, EtOAc 33% đến 60% trong n-heptan) để thu được 0,329 g Hợp chất 211 dưới dạng chất rắn bột màu trắng.

Hợp chất 211: LC/MS (ESI) m/z 1555,48 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 8

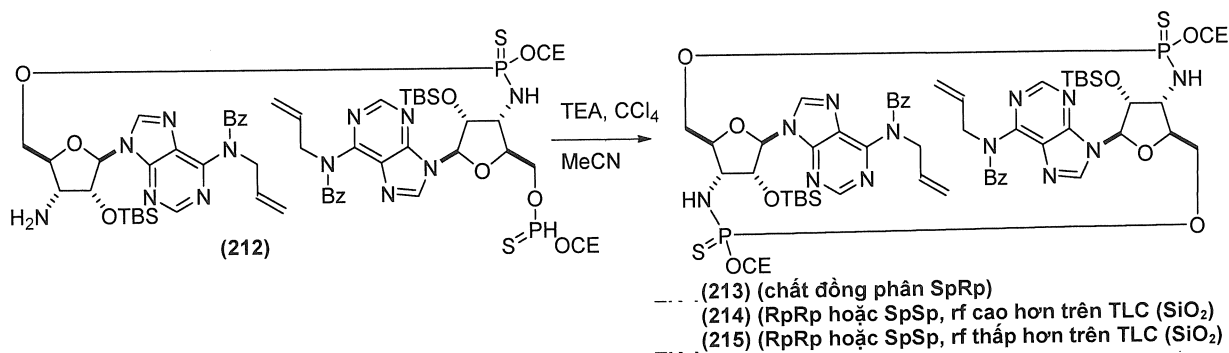


Bổ sung nước (0,032 ml, 1,8 mmol) và axit dicloroaxetic (0,29 ml, 3,6 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 211 (0,329 g, 0,211 mmol) trong diclorometan (7,2 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (30 phút), hỗn hợp phản ứng này là dung dịch NaHCO_3 bão hòa (25 mL). Hỗn hợp tạo thành được chiết hai lần bằng DCM (30 mL mỗi lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước NaCl 30% (20 mL), được làm khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không.

Sản phẩm thô Hợp chất 212 (sản lượng lý thuyết 0,278 g) được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Hợp chất 212: LC/MS (ESI) m/z 1313,40[M+H]⁺.

Bước 9



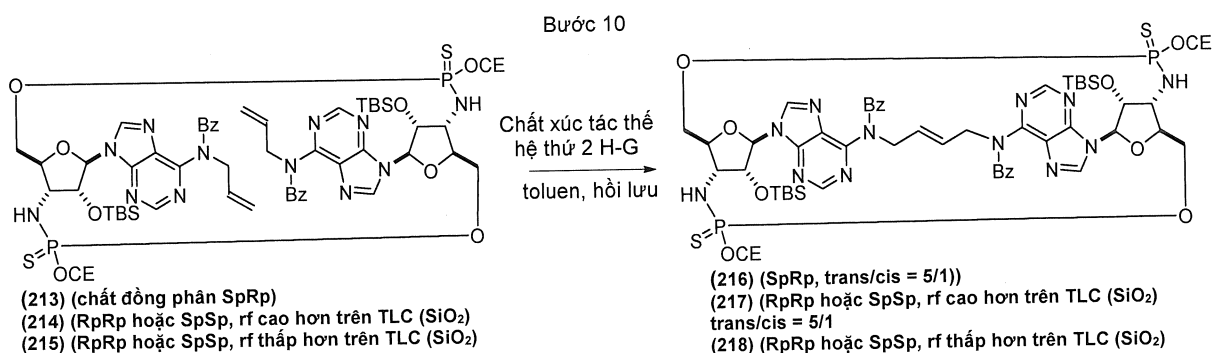
Bổ sung triethyl amin (1,0 ml, 7,2 mmol) và CCl₄ (1,0 ml, 10 mmol) vào dung dịch chứa Hợp chất 212 (0,278 g, 0,212 mmol) trong MeCN (55,6 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (30 phút), hỗn hợp phản ứng này được cô đến ~20 mL trong chân không và được hòa tan bằng MTBE (30 mL). Hỗn hợp tạo thành được rửa bằng nước (10 ml) và dung dịch nước NaCl 30% hai lần (10 mL mỗi lần), được làm khô trên MgSO₄, được lọc và được cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO₂ 25g, EtOAc 20% đến 75% trong n-heptan) để thu được 71 mg Hợp chất 213 (chất đồng phân SpRp), 43 mg Hợp chất 214 (chất đồng phân RpRp hoặc SpSp, rf cao hơn trên TLC (SiO₂)), và 24 mg Hợp chất 215 (chất đồng phân RpRp hoặc SpSp, rf thấp hơn trên TLC (SiO₂)).

Hợp chất 213 (chất đồng phân SpRp) ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,58 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,46 (dd, J = 7,2, 15,4 Hz, 4H), 7,36 - 7,27 (m, 2H), 7,18 (q, J = 7,6 Hz, 4H), 6,09 (s, 1H), 5,98 (s, 1H), 6,06 - 5,95 (m, 2H), 5,25 (d, J = 11,3 Hz, 1H), 5,21 (dd, J = 1,4, 10,4 Hz, 1H), 5,12 - 5,03 (m, 3H), 5,00 - 4,92 (m, 3H), 4,87 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 4,60 (br d, J = 11,7 Hz, 1H), 4,55 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,44 (br d, J = 11,3 Hz, 1H), 4,39 - 4,32 (m, 2H), 4,26 - 4,08 (m, 8H), 3,75 (dd, J = 11,3, 16,0 Hz, 1H), 3,49 (dd, J = 8,2, 10,6 Hz, 1H), 2,82 - 2,72 (m, 3H), 2,61 (td, J = 5,9, 17,2 Hz, 1H), 0,99 (s, 9H), 0,96 (s, 9H), 0,32 (s, 3H), 0,23 (s, 6H), 0,22 (s, 3H).

Hợp chất 214 (chất đồng phân RpRp hoặc SpSp, rf cao hơn trên chất đồng phân TLC (SiO₂)): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,60 (s, 2H), 8,18 (s, 2H), 7,50 (d, *J* = 7,0 Hz, 4H), 7,37 - 7,31 (m, 2H), 7,25 - 7,21 (m, 4H), 6,05 - 5,93 (m, 4H), 5,22 (dd, *J* = 1,6, 17,2 Hz, 2H), 5,09 (dd, *J* = 1,0, 10,4 Hz, 2H), 5,00 - 4,83 (m, 6H), 4,61 (dd, *J* = 1,2, 11,7 Hz, 2H), 4,25 (dq, *J* = 4,3, 10,8 Hz, 2H), 4,09 (br dd, *J* = 3,7, 10,4 Hz, 2H), 4,04 (td, *J* = 5,5, 10,9 Hz, 2H), 3,99 - 3,88 (m, 4H), 3,70 (dd, *J* = 11,9, 15,0 Hz, 2H), 2,71 (td, *J* = 5,5, 17,1 Hz, 2H), 2,49 - 2,37 (m, 2H), 0,98 (s, 18H), 0,25 (s, 6H), 0,24 (s, 6H).

Hợp chất 215 (chất đồng phân RpRp hoặc SpSp, rf thấp hơn trên chất đồng phân TLC (SiO₂)): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,54 (s, 2H), 8,06 (s, 2H), 7,47 - 7,44 (m, 4H), 7,32 - 7,27 (m, 2H), 7,20 - 7,15 (m, 4H), 6,06 - 5,95 (m, 2H), 5,92 (d, *J* = 3,5 Hz, 2H), 5,22 (dd, *J* = 1,2, 17,2 Hz, 2H), 5,07 (dd, *J* = 1,4, 10,4 Hz, 2H), 5,04 - 4,94 (m, 6H), 4,62 - 4,52 (m, 2H), 4,46 - 4,40 (m, 2H), 4,40 - 4,22 (m, 8H), 3,81 (dd, *J* = 6,6, 12,1 Hz, 2H), 2,89 - 2,71 (m, 4H), 0,88 (s, 18H), 0,08 (s, 6H), -0,07 (s, 6H).

Bước 10



Bổ sung dung dịch chứa chất xúc tác thể hệ thứ hai Hoveyda-Grubbs (17,0 mg, 0,027 mmol) và P-benzoquinon (11,70 mg, 0,108 mmol) trong toluen (8 mL) vào dung dịch chứa Hợp chất 213 (71 mg, 0,054 mmol) trong toluen (28,4 ml) tại hồi lưu. Hỗn hợp này được đun hồi lưu và quy trình phản ứng được theo dõi bằng LC/MS. Sau 3 giờ, chất xúc tác bổ sung (8,5 mg, 0,0135 mmol) trong toluen (2,5 mL) được bổ sung và phản ứng được tiếp tục trong 2,5 giờ giờ. Sau khi làm mát xuống, hỗn hợp này được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (SiO₂ 10g, etyl axetat 33% đến 66% trong n-heptan) để thu được 17 mg Hợp chất 216 (trans/cis = 5/1) dưới dạng bột khô màu nâu.

Hợp chất 216: ^1H NMR (chỉ chất đồng phân trans, 400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,37 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,36 - 7,27 (m, 3H), 7,24 - 7,13 (m, 5H), 5,97 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 5,75 (td, J = 5,5, 15,2 Hz, 1H), 5,69 (td, J = 5,5, 15,6 Hz, 1H), 5,07 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 5,03 (dd, J = 5,1, 15,2 Hz, 1H), 4,94 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 4,85 (dd, J = 5,1, 15,2 Hz, 1H), 4,74 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,67 (br d, J = 12,1 Hz, 1H), 4,45 (br d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,42 - 4,34 (m, 2H), 4,28 - 4,19 (m, 2H), 4,19 - 4,06 (m, 4H), 3,96 - 3,84 (m, 1H), 3,82 - 3,68 (m, 1H), 3,56 (br dd, J = 12,1, 14,5 Hz, 1H), 3,33 (dd, J = 9,0, 10,9 Hz, 1H), 2,83 - 2,78 (m, 2H), 2,72 (td, J = 5,6, 16,6 Hz, 1H), 2,39 (td, J = 6,3, 17,2 Hz, 1H), 1,00 (s, 18H), 0,42 (s, 3H), 0,40 (s, 3H), 0,34 (s, 3H), 0,30 (s, 3H).

Hợp chất 217

Hợp chất 214 thu được từ Bước 9 được xử lý riêng rẽ thông qua Bước 10 để thu được Hợp chất 217 (5/1 hỗn hợp các chất đồng phân trans/cis).

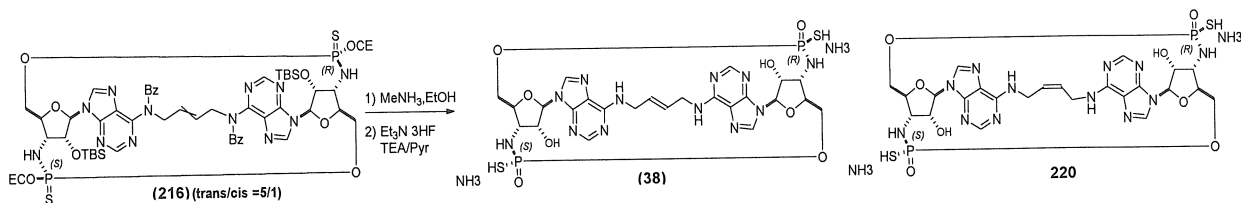
^1H NMR (chỉ chất đồng phân trans, 400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,47 (s, 2H), 8,14 (s, 2H), 7,43 - 7,38 (m, 4H), 7,36 - 7,29 (m, 2H), 7,22 (t, J = 7,0 Hz, 4H), 5,83 (s, 2H), 5,77 (t, J = 3,3 Hz, 2H), 5,17 (d, J = 3,5 Hz, 2H), 5,11 - 5,04 (m, 2H), 4,70 (br dd, J = 3,5, 16,4 Hz, 2H), 4,62 (br d, J = 12,1 Hz, 2H), 4,16 - 4,08 (m, 6H), 3,93 (br dd, J = 3,7, 11,9 Hz, 2H), 3,74 - 3,64 (m, 2H), 3,49 (t, J = 12,9 Hz, 2H), 2,42 (td, J = 5,9, 18,4 Hz, 2H), 2,13 (ddd, J = 5,5, 7,8, 16,8 Hz, 2H), 1,00 (s, 18H), 0,40 (s, 6H), 0,34 (s, 6H).

Hợp chất 218

Hợp chất 215 thu được từ Bước 9 được xử lý riêng rẽ thông qua Bước 10 để thu được Hợp chất 218.

^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,14 (s, 2H), 8,12 (s, 2H), 7,49 - 7,43 (m, 2H), 7,36 - 7,27 (m, 4H), 7,19 - 7,12 (m, 4H), 5,96 (s, 2H), 5,67 - 5,54 (m, 2H), 4,95 - 4,82 (m, 4H), 4,69 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 4,60 - 4,09 (m, 12H), 3,63 (dd, J = 8,8, 16,2 Hz, 2H), 2,93 (td, J = 5,9, 17,2 Hz, 2H), 2,82 - 2,72 (m, 2H), 0,99 (s, 18H), 0,30 (s, 6H), 0,27 (s, 6H).

Bước 11



Bổ sung dung dịch metylamin (2 ml) (33% trong EtOH) vào Hợp chất 216 (trans/cis = 5/1, 17 mg, 0,013 mmol) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Dung dịch tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong khi được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (1 giờ), hỗn hợp phản ứng này được cô trong chân không. Phần cặn được bổ sung pyridin (0,9 ml), TEA (0,45 ml) và triethylamin trihydroflorua (0,36 ml, 2,2 mmol). Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở 50-60°C trong 4 giờ và được làm mát đến nhiệt độ môi trường xung quanh. Sau khi khử bảo vệ TBS hoàn thành (được theo dõi bằng LCMS), hỗn hợp phản ứng này được xử lý bằng metoxytrimetylsilan (1,5 ml, 12 mmol) và được khuấy trong 1 giờ. nước (3 mL) được bổ sung và hỗn hợp tạo thành được chiết bằng toluen hai lần (3 ml mỗi lần) và EtOAc hai lần (2 mL mỗi lần). Lớp nước được lọc bằng bộ lọc ống tiêm và chất lọc được cho qua HPLC điều chế để thu được 5,3 mg Hợp chất 38 và 1,1 mg Hợp chất 220.

Hợp chất 38 (*SpRp*, *trans*): ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,27 (br s, 1H), 8,47 (br s, 1H), 8,21 (br s, 1H), 8,09 (br s, 1H), 6,19 - 5,96 (m, 2H), 5,94 - 5,71 (m, 2H), 5,13 - 4,68 (m, 2H), 4,55 - 4,39 (m, 2H), 4,38 - 4,23 (m, 1H), 4,20 - 3,91 (m, 5H), 3,75 - 3,50 (m, 4H).

Hợp chất 220 (*SpRp*, *cis*): ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,08 (s, 1H), 8,72 (br s, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 6,22 - 6,14 (m, 2H), 6,10 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 5,01 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,41 (br d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,34 - 4,25 (m, 3H), 4,24 - 4,18 (m, 1H), 4,15 (dd, J = 6,1, 11,5 Hz, 1H), 4,08 - 3,99 (m, 4H), 3,71 - 3,57 (m, 3H).

Hợp chất 39 và Hợp chất 222

Hợp chất 217 được xử lý riêng rẽ thông qua Bước 11 để thu được Hợp chất 39 và Hợp chất 222.

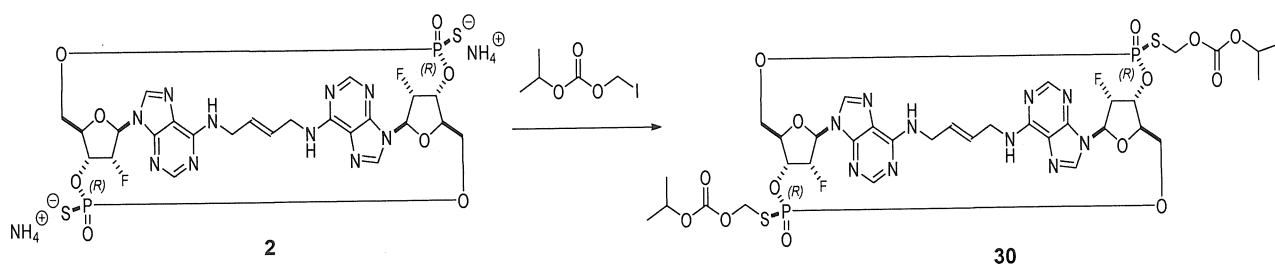
Hợp chất 39 (chất đồng phân *trans*): ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,83 (br s, 1H), 8,43 (br s, 1H), 8,17 (br s, 1H), 8,11 (br s, 1H), 6,17 - 5,95 (m, 2H), 5,93 - 5,63 (m, 2H), 5,10 - 4,78 (m, 2H), 4,69 - 4,53 (m, 1H), 4,52 - 4,35 (m, 2H), 4,12 - 3,92 (m, 5H), 3,76 - 3,44 (m, 4H).

Hợp chất 222 (chất đồng phân *cis*): ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 8,71 (br s, 2H), 8,18 (s, 2H), 6,17 - 6,06 (m, 4H), 4,37 (br d, J = 9,8 Hz, 2H), 4,33 (d, J = 3,9 Hz, 2H), 4,27 (br dd, J = 7,0, 13,7 Hz, 2H), 4,06 (dd, J = 7,0, 11,3 Hz, 2H), 4,19 - 4,03 (m, 2H), 4,01 (br d, J = 9,8 Hz, 2H), 3,74 (ddd, J = 3,9, 6,4, 10,5 Hz, 2H).

Hợp chất 40

Hợp chất 218 được xử lý riêng rẽ thông qua Bước 11 để thu được Hợp chất 40: ^1H NMR (400 MHz, METANOL- d_4) δ = 9,34 – 8,88 (m, 2H), 8,73 (br s, 1H), 8,34 - 8,02 (m, 2H), 6,20 - 5,96 (m, 2H), 5,89 (br s, 2H), 5,25 - 4,95 (m, 2H), 4,76 - 4,64 (m, 1H), 4,47 - 4,22 (m, 2H), 4,20 - 4,07 (m, 2H), 4,07 - 3,93 (m, 2H), 3,82 - 3,55 (m, 3H), 3,54 - 3,38 (m, 2H)

Ví dụ 24 – Tổng hợp Hợp chất 30



Hợp chất 2 (1,1 mg, 1,4 μmol) được bổ sung vào dung dịch iodomethyl isopropyl cacbonat (13,75 mg, 0,056 mmol) trong axeton/nước (0,4/0,10 ml) ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Hỗn hợp tạo thành được khuấy ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong tối trong khi phản ứng được theo dõi bằng LCMS. Khi hoàn thành (2 giờ), hỗn hợp phản ứng này được hòa tan bằng nước (0,4 ml) và được chiết bằng n-neptan ba lần (0,5 mL mỗi lần). Tinh chế sản phẩm thô trong lớp nước tạo ra 0,5 mg Hợp chất 30.

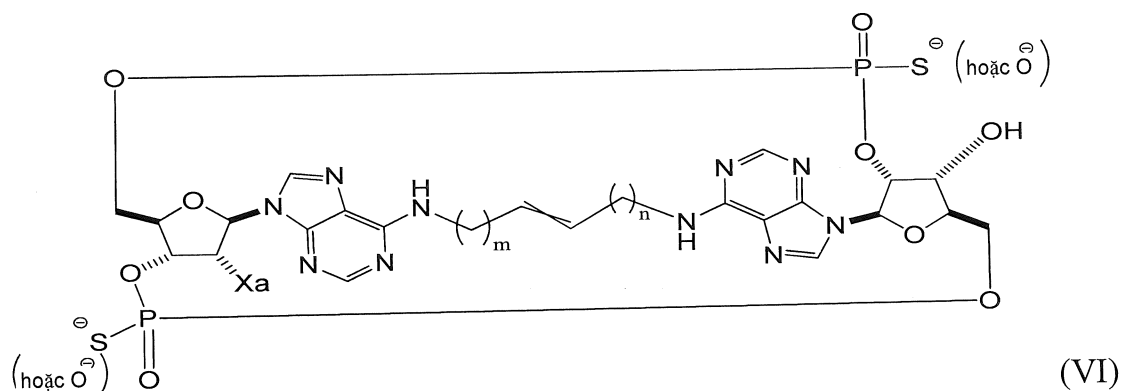
^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ = 7,92 (s, 2H), 7,72 (br s, 2H), 6,22 (d, J = 17,2 Hz, 2H), 6,19 - 6,03 (m, 2H), 5,98 (br t, J = 6,3 Hz, 2H), 5,82 - 5,77 (m, 2H), 5,68 (dd, J = 2,3, 51,6 Hz, 1H), 5,54 (dd, J = 10,9, 13,7 Hz, 2H), 5,48 (dd, J = 10,9, 12,9 Hz, 2H), 4,94 (quin, J = 6,2 Hz, 2H), 4,71 - 4,63 (m, 2H), 4,63 - 4,56 (m, 2H), 4,50 - 4,43 (m, 2H), 4,22 - 4,12 (m, 2H), 4,05 - 3,90 (m, 2H), 1,33 (d, J = 4,3 Hz, 6H), 1,32 (d, J = 4,3 Hz, 6H).

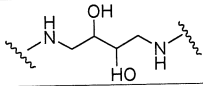
Ví dụ 103 – Thử nghiệm báo cáo hoạt tính chủ vận HAQ STING

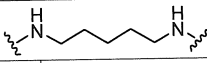
Các tế bào THP1-Dual™ (InvivoGen, Cat# thpd-nfis) được sử dụng để xác định EC₅₀. Các tế bào THP1 Dual™ đã được mô tả đặc điểm để mang kiểu gen HAQ STING bởi nhà cung cấp Invivogen (Insight 201402-1). Các tế bào được sinh trưởng và được giữ trong các điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Sự cảm ứng con đường yếu tố điều hòa interferon (IRF) được mô tả theo hướng dẫn của nhà sản xuất là để xác định giá trị EC₅₀. Tóm lại, tế bào được gieo mầm và được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của hợp chất trong 20 giờ trong khi được ủ ở 37°C, CO₂ 5 . Tế bào được tái tạo huyền phù và dung dịch QUANTI-Luc™ (Cat. # : rep-qlc1) được bổ sung. Sự phát xạ ánh sáng tạo thành được đo bằng máy đo độ sáng (Envision, Perkin Elmer). Các tín hiệu thu được được lập biểu đồ và EC₅₀ được tính bằng phần mềm GraphPad Prism7.

Các giá trị EC₅₀ được báo cáo trong các Bảng 4-8 dưới đây. Các giá trị EC₅₀ có thể là từ một thử nghiệm hoặc giá trị trung bình của nhiều thử nghiệm. Trước mỗi bảng là cấu trúc được sử dụng để xem xét bảng đó.

Bảng 4.



Cầu nối (nguyên tử cacbon trong mạch giữa (m) và (n), tính toàn bộ)				Xa tại 2'	Bất đối xứng P		Hợp chất số	STING EC ₅₀ người (μM)				
Độ dài	m	n	Dạng hình học		phía 2'	phía 3'		HAQ	WT	AQ	REF	
cầu nối 4 cacbon	1	1	trans	Xa= OH	S	S	223	*	N/E	N/E	N/E	
					S	R	13	26,7	N/E	N/E	N/E	
					R	R	14	58,2	69,8	*	*	
			cis		S	R	224	*	N/E	N/E	N/E	
					S	S	225	*	N/E	N/E	N/E	
									N/E	N/E	N/E	
			TBD		Không áp dụng được (phosphodi este)		226	*	N/E	N/E	N/E	
			TBD				227	*	N/E	N/E	N/E	
							228	*	N/E	N/E	N/E	
			trans		Xa= F	S	R	15	24,7	11,6	13,1	66,7
R	R	16		28,8		25,7	20,4	66,7				

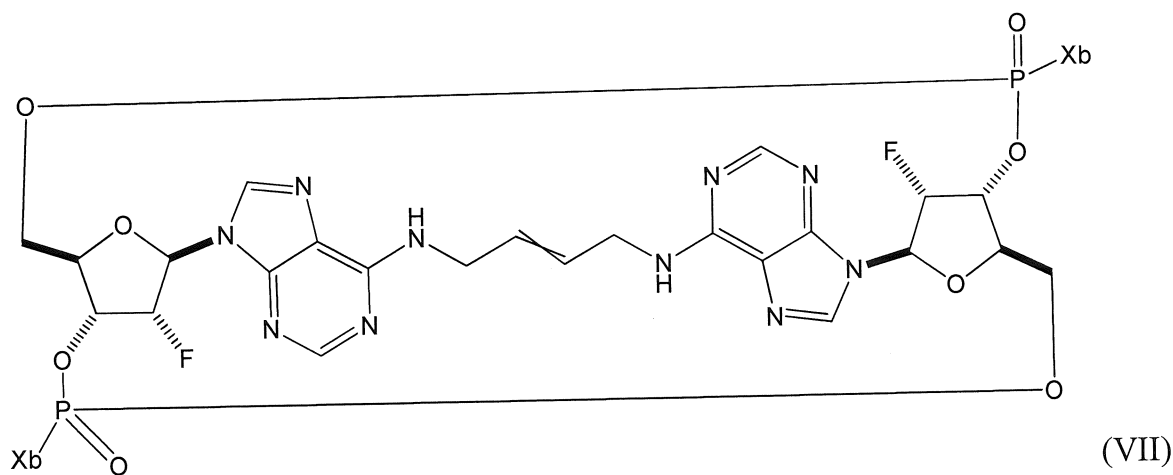
			cis		<i>R</i>	<i>R</i>	229	*	N/E	N/E	N/E					
cầu nối 5 cacbon	2	1	trans	Xa= OH	<i>R</i>	<i>R</i>	230	*	N/E	N/E	N/E					
			TBD		231	*		N/E	N/E							
			TBD		232	*		N/E	N/E							
		Trans (hỗn hợp 2:1)	S		R	233	*	N/E	N/E	N/E						
	Trans (hỗn hợp 3:1)															
	trans	<i>S</i>									<i>R</i>	234	*	N/E	N/E	N/E
	cis	TBD									235	*		N/E	N/E	
	1	2	trans		TBD		236	*		N/E	N/E					
			cis		<i>S</i>	<i>R</i>	237	*	N/E	N/E	N/E					
			TBD		TBD		238	*		N/E	N/E					
					<i>R</i>	<i>R</i>	239	*	N/E	N/E	N/E					
	cầu nối 6 cacbon	2	2		TBD	<i>S</i>	<i>R</i>	240	*			N/E				
TBD				<i>S</i>	<i>R</i>	241	*	N/E	N/E	N/E						
TBD				<i>S</i>	<i>R</i>	242	*	N/E	N/E	N/E						
			<i>R</i>	<i>R</i>	243	*	N/E	N/E	N/E							

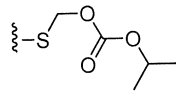
* để chỉ hoạt tính không đo được trong phạm vi nồng độ thí nghiệm.

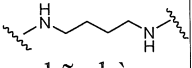
“N/E” để chỉ “không được đánh giá.”

STING EC₅₀ người (μM) được đo bằng cách sử dụng dạng muối amoni của từng hợp chất trong Bảng 4.

Bảng 5.



Các cầu nối 4 cacbon (giữa NH trong chuỗi)	Các môi liên kết P		Hợp chất số	STING EC ₅₀ người (μM)			
	Bất đối xứng	Xb		HAQ	WT	AQ	REF
trans	-	OH	9	39,2	18,0	30,9	31,7
	RR		30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	SR	-SH	1	4,1	0,9	1,2	4,8
	SS		3	16,4	9,9	13,7	42,7

	RR		2	6,1	3,4	3,5	11,4
Hỗn hợp trans/cis	RR		10	17,9	9,0	10,2	34,3
cis	SS		244	*	>100	>100	>100
	RR		4	10,6	3,9	8,2	>100
	SR		5	87,1	49,1	>100	>100
 bảo hòa	SR		6	10,5	5,7	9,0	42,0
5C cis/trans TBD	N.D.		245	*	N/E	N/E	N/E
			246	*	N/E	N/E	N/E
5C trans	N.D.		8	69,7	68,7	81,0	>100
5C trans	N.D.		7**	10,7	8,0	9,0	66,7
5C trans	N.D.		37	87,2	>100	82,2	>100
5C trans	N.D.		11	6,8	N/E	N/E	N/E
5C trans	N.D.		12	8,2	N/E	N/E	N/E

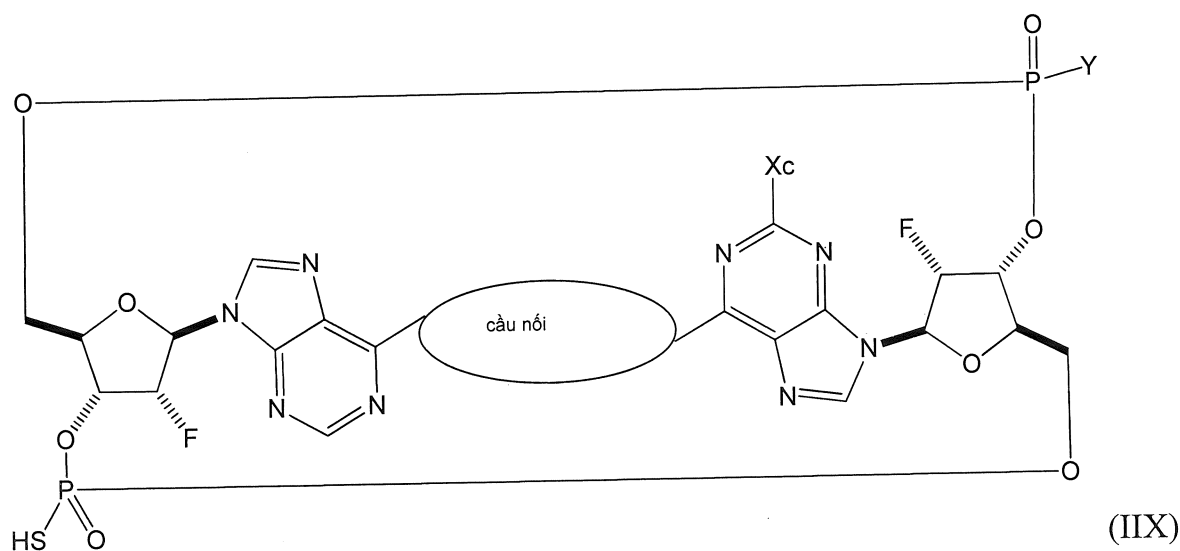
* để chỉ hoạt tính không đo được trong phạm vi nồng độ thí nghiệm.

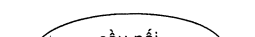
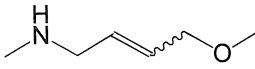
**Hợp chất 7 là hỗn hợp 1:1 chứa Hợp chất 11 và Hợp chất 12.

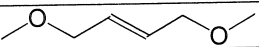
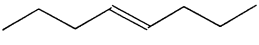
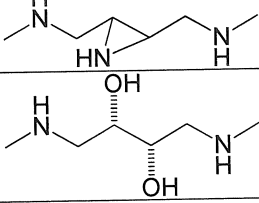
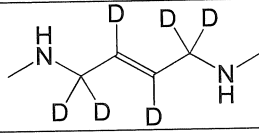
“N/E” để chỉ “không sẵn có.” “N.D.” để chỉ “không được xác định.”

STING EC₅₀ người (μM) được đo bằng cách sử dụng dạng muối amoni của từng hợp chất được liệt kê trong Bảng 5.

Bảng 6.



Cặp bazơ	Xc=	Y=		Dạng hình học	Bất đối xứng P	Hợp chất số	hSTING EC50 (μM)	
							HAQ	REF
AG	NH ₂	SH		cis	N.D.	247	*	N/E
				trans		22	41,2	N/E
					N.D.	21	83,3	N/E
					TBD	23	62,3	N/E
AI	H		cis			248	*	N/E

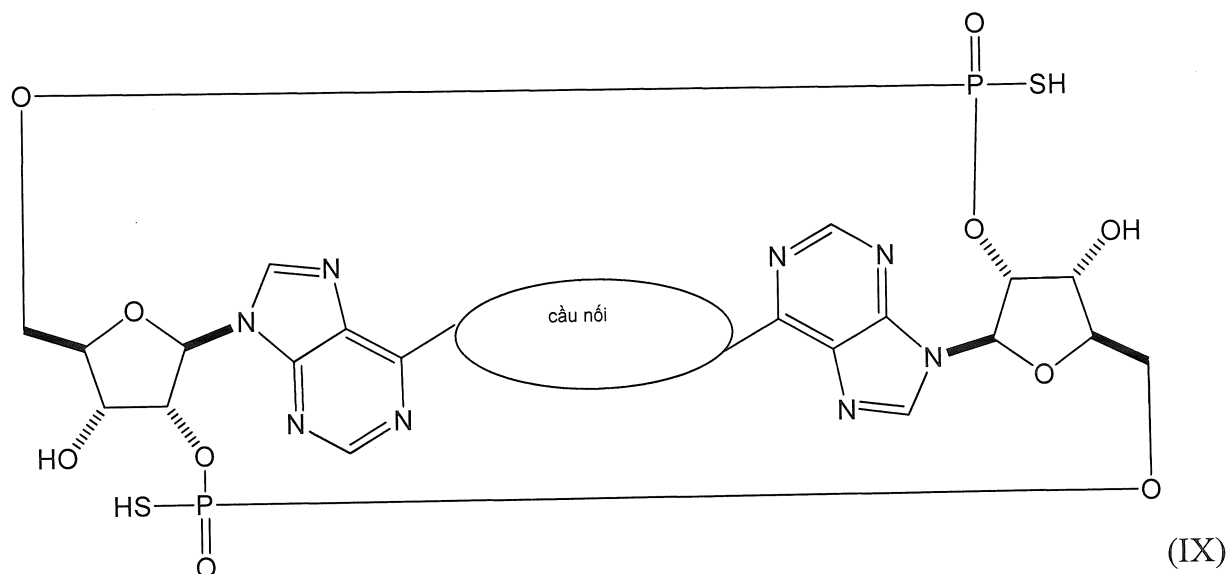
II	AA	OH		trans		249	*	N/E
						18	2,3	N/E
						19	94,1	N/E
						20	2,8	N/E
				trans	RR	26	2,3	7,4
					SR	33	21,5	*
					RR	34	2,3	*
					SS	250	*	*
				-	SR	35	44,5	67,2
					SR	36	31,4	94,1
					SR	32	15,7	*
					SR	29	0,62	8,4
				trans	SR	25	0,73	3,0
					S	27	9,8	27,6
					R	28	10,2	18,4

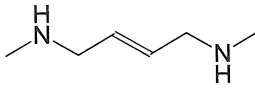
* để chỉ hoạt tính không đo được trong phạm vi nồng độ thí nghiệm.

“N/E” để chỉ “không được đánh giá.” “N.D.” để chỉ “không được xác định.”

STING EC50 người (μM) được đo bằng cách sử dụng dạng muối amoni của từng hợp chất được liệt kê trong Bảng 6 ngoại trừ Hợp chất 26, Hợp chất 31, Hợp chất 33, và Hợp chất 34, tất cả chúng được thử nghiệm dưới dạng muối bis-TEA.

Bảng 7.

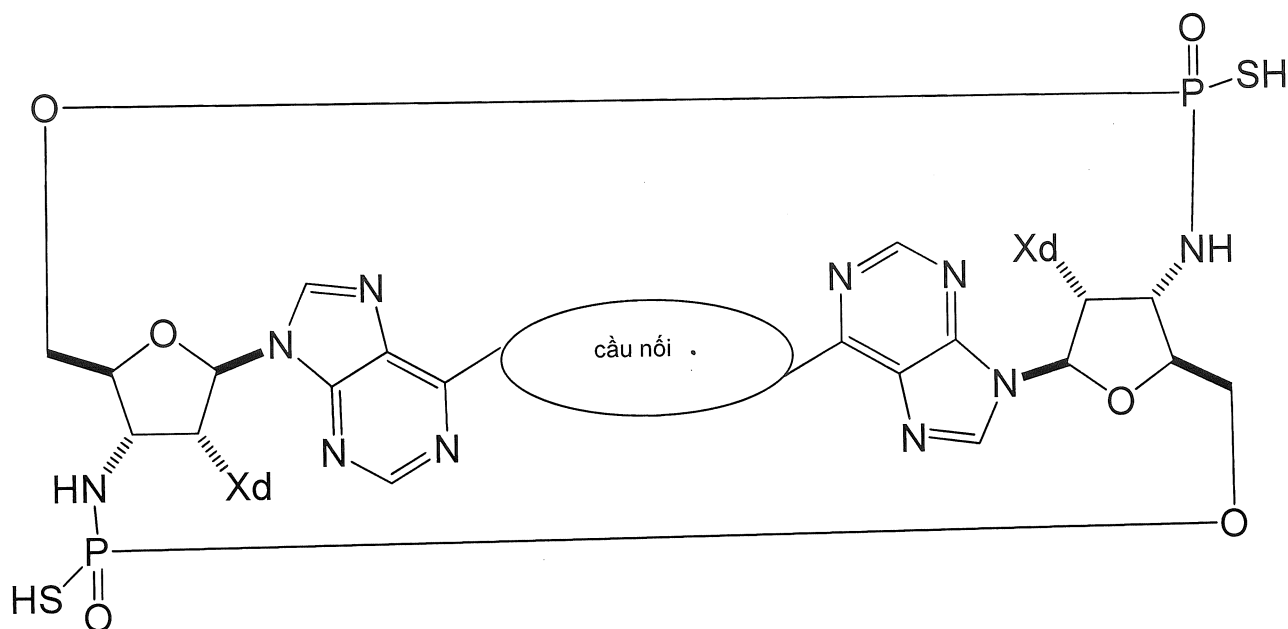


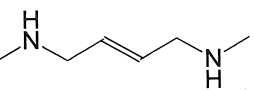
Cặp bazơ		Dạng hình học	Bất đối xứng P	Hợp chất số	hSTING EC50 (μM)	
					HAQ	REF
AA		trans	SS hoặc RR	251	*	*
			SS hoặc RR	252	*	*
			RR	31	20,2	*

* để chỉ hoạt tính là không đo được trong phạm vi nồng độ thí nghiệm.

STING EC50 người (μM) được đo bằng cách sử dụng dạng muối amoni của từng hợp chất trong Bảng 7.

Bảng 8



Xd=		Hình học	Bất đối xứng P	Số Hợp chất	hSTING EC50 (μM)	
					HAQ	REF
OH		trans	SR	38	79,9	*
			SS hoặc RR	39	29,6	*

* để chỉ hoạt tính không đo được trong phạm vi nồng độ thí nghiệm.

STING EC50 người (μM) được đo bằng cách sử dụng dạng muối amoni của từng hợp chất trong Bảng 8.

Ví dụ 104 – Thử nghiệm báo cáo đặc hiệu biến thể STING

STING người có 4 biến thể chính, bao gồm các biến thể WT, HAQ, REF, và AQ. REF-STING, còn được gọi là R232H, ví dụ, xuất hiện trong khoảng 14% quần thể người. So sánh với alen dạng dại, R232H đã giảm sự đáp ứng với các di-nucleotit dạng vòng vi khuẩn và metazoan. Chi tiết về 4 biến thể chính này cũng như các biến thể hiếm khác được báo cáo bởi Yi G, *et al.*, “Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides” *PLoS One* 2013; 8:e77846. Các dòng tế bào báo cáo đặc hiệu biến thể STING được thiết lập bằng cách sử dụng các tế bào THP1-Dual™ KO-STING (InvivoGen, Cat# thpd-kostg) và ba vector biểu hiện protein biến thể STING. Bản đồ vector biểu hiện cho WT STING được thể hiện trên FIG. 6. Đối với hai vector biểu hiện khác, các trình tự biến thể STING khác nhau được sử dụng trong vector đó, với WT STING được thay thế bằng trình tự nucleotit thích hợp.

Các vector biểu hiện biến thể STING cho WT-STING, REF-STING, và AQ-STING được tạo ra và được chuyển nhiễm ổn định vào các tế bào THP1-Dual™ KO-STING để tạo ra thử nghiệm báo cáo đặc hiệu biến thể STING lần lượt cho WT-STING, REF-STING và AQ-STING. Các giá trị EC₅₀ được xác định như được mô tả trên đây trong Ví dụ 103 cho thử nghiệm báo cáo hoạt tính chủ vận HAQ STING. Các kết quả được thể hiện dưới đây trong Bảng 9. Các trình tự ADN được sử dụng cho các biến thể STING này được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 (trình tự nucleotit của WT STING người), SEQ ID NO: 2 (trình tự nucleotit của REF STING người), và SEQ ID NO: 3 (trình tự nucleotit của AQ Sting người).

WT STING người:

```
atgccccactccagcctgcatccatccatcccggtgtcccaggggtcacggggcccaagaaggcagccttggtctgctgagt
gcctgcctggtagcccttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtacctggtagctccacctagcctccctg
cagctgggactgctgttaaagggtctgcagcctggctgaggagctgcgccacatccactccaggtaccggggcagcta
ctggaggactgtgcgggcctgcctgggctgccccctccgccgtggggccctgttgctgtgtccatctatttctactactccct
cccaaatgcggtcggcccgcccttcactggatgcttgccctcctgggcctctgcaggcactgaacatcctcctgggcctc
aagggcctggccccagctgagatctctgcagtgtgtgaaaaagggaattcaacgtggcccatgggctggcatggtcatatt
acatcgatatctgcggctgatcctgccagagctccaggcccgattcgaactacaatcagcattacaacaacctgctacg
gggtgcagtgagccagcggctgtatattctcctccattggactgtggggctgctgataacctgagtatggctgaccccaac
attcgcttctggataaactgccccagcagaccggtgaccgggctggcatcaaggatcggggttacagcaacagcatctatg
```

agcttctggagaacgggcagcgggacgtgtcctggagtagccaccccttgacagactttgttgccatgtcaca
 atacagtcaagctggcttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactcttctgccggacacttgaggacatcctggc
 agatgcccctgagttctcagaacaactgccgcctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgtgtcccag
 gaggttctccggcacctgcggcaggaggaaaaggaagaggttactgtgggcagcttgaagacctcagcgggtgccagta
 cctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagcccctccctctccgcacggatttcttga
 (SEQ ID NO: 1).

REF STING người:

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccagaaggcagccttggttctg
 ctgagtgcctgcctggtgacctttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtacctggtgctccacctagcc
 tccctgcagctgggactgctgttaaagggtctgcagcctggctgaggagctgcgccacatccactccaggtaccgggg
 cagctactggaggactgtgcgggcctgcctgggctgccccctccgctggggccctgttctgtgtccatctatttctact
 actccctcccaaatgcggtcggcccgcccttcacttgatgcttgcctcctgggcctctcgcaggcactgaacatcctcctg
 ggcctcaaggcctggccccagctgagatctctgcagtgtgtgaaaaagggaattcaacgtggcccatgggctggcatgg
 tcatattacatcgatattctgcggctgatcctgccagagctccaggcccgattcgaacttacaatcagcattacaacaacctg
 ctacggggtgcagtgagccagcggctgtatattctcctccattggactgtggggtgcctgataacctgagtatggctgacct
 caacattcgcttctggataaactgccccagcagaccggtgacctgctggcatcaaggatcggtttacagcaacagcatc
 tatgagcttctggagaacgggcagcgggacgtgtcctggagtagccaccccttgacagactttgttgccatgt
 cacaatacagtcaagctggcttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactcttctgccggacacttgaggacatcct
 ggcagatgcccctgagttctcagaacaactgccgcctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgtgtcc
 caggaggttctccggcacctgcggcaggaggaaaaggaagaggttactgtgggcagcttgaagacctcagcgggtgccca
 gtacctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaatggaaaagcccctccctctccgcacggatttcttga
 (SEQ ID NO: 2)

AQ STING người:

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccagaaggcagccttggttctgctgagt
 gcctgcctggtgacctttgggggctaggagagccaccagagcacactctccggtacctggtgctccacctagcctccctg
 cagctgggactgctgttaaagggtctgcagcctggctgaggagctgcgccacatccactccaggtaccggggcagcta
 ctggaggactgtgcgggcctgcctgggctgccccctccgctggggccctgttctgtgtccatctatttctactactccct
 cccaaatgcggtcggcccgcccttcacttgatgcttgcctcctgggcctctcgcaggcactgaacatcctcctggggctc
 aagggcctggccccagctgagatctctgcagtgtgtgaaaaagggaattcaacgtggcccatgggctggcatggctcatatt
 acatcgatattctgcggctgatcctgccagagctccaggcccgattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacg
 ggtgagtgagccagcggctgtatattctcctccattggactgtggggtgcctgataacctgagtatggctgaccccaac

atcgccttcctggataaactgccccagcagaccgctgaccgagctggcatcaaggatcggtttacagcaacagcatctatg
 agcttctggagaacgggcagcgggacgtgtgtcctggagtacgccacccccctgcagactttgttgccatgtcaca
 atacagtcaagctggcttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactcttctgccagacacttgaggacatcctggca
 gatgcccctgagttcagaacaactgccgcctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgctgtcccagg
 aggttctccggcacctgcggcaggaggaaaaggaagaggttactgtgggcagcttgaagacctcagcgggtgccagtac
 ctccacgatgtccaagagcctgagctcctcatcagtggaaatggaaaagccccctcctctccgcacggatttctctga
 (SEQ ID NO: 3)

Ví dụ 105 -- Thử nghiệm báo cáo hoạt tính chủ vận STING chuột nhắt

Các tế bào RAW-Lucia™ ISG (InvivoGen, Cat# rawl-isg) được sử dụng cho thử nghiệm báo cáo chủ vận STING chuột nhắt. Các giá trị EC₅₀ được xác định như được mô tả trên đây trong Ví dụ 103 trong thử nghiệm báo cáo hoạt tính chủ vận HAQ STING. Các kết quả được thể hiện dưới đây trong Bảng 9.

Ví dụ 106 -- Thử nghiệm đo huỳnh quang quét vi sai (DSF)

Thử nghiệm DSF được sử dụng để đo sự tác động vật lý giữa hợp chất và protein STING tái tổ hợp. Protein STING tái tổ hợp đã được cắt cụt (a.a.155-341) (SEQ ID NO: 4) được biểu hiện trong *E. coli* và được phân lập cho thử nghiệm này, như được mô tả dưới đây. Chất nền thử nghiệm được điều chế trong các đĩa 384 giếng đến thể tích cuối là 10 µL trên mỗi giếng gồm 1 µM protein STING tái tổ hợp (a.a. 155-341) (SEQ ID NO: 4), 100 mM PBS pH 7,4, được bổ sung bằng 100 mM KCl, chất nhuộm màu vàng cam 5X SYPRO và hợp chất 50 µM (nồng độ DMSO cuối là 0-1%). Các thử nghiệm được thực hiện trên hệ thống PCR thời gian thực QuantStudio 12K Flex bằng cách sử dụng gradien nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 95°C ở tốc độ 0,05°C/phút, và bộ lọc kích thích và phát xạ lần lượt tại 470 và 586 nm. Theo các đường cong đạo hàm huỳnh quang được chỉ định bởi phần mềm Applied Biosystems® Protein Thermal Shift (thuật toán phiên bản 1.3.), nhiệt độ nóng chảy (T_m) của protein STING tái tổ hợp không liên kết và liên kết với phối tử và sự sai khác về nhiệt độ nóng chảy (dT_m D) được tính.

Nhìn chung, các hợp chất với các giá trị ΔT_m lớn hơn 0 được coi là có sự tương tác vật lý với protein thử nghiệm, và giá trị ΔT_m liên quan thuận với ái lực liên kết hợp chất. Ở đây, Hợp chất 1a thể hiện ΔT_m là 17,6 (Bảng 9), chỉ ra tương tác vật lý với protein STING.

Bảng 9. Đặc tính *in vitro* Hợp chất 1a

Hợp chất	STING EC ₅₀ người (μM)				STING chuột EC ₅₀ nhất (μM)	DSF WT STING ΔTm (°C)
	WT	HAQ	REF	AQ		
1a	0,9	4,1	4,8	1,2	3,4	17,6

Ví dụ 107 – Thử nghiệm sự kích thích PBMC người *ex vivo*

Máu người từ 5 đối tượng cho khỏe mạnh được thu gom bằng cách sử dụng các ống 10,0 mL BD Vacutainer natri heparin (cat# 367874). Việc phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được thực hiện bằng cách sử dụng các ống SIGMA ACCUSPIN 50ml (cat# A2055) và sigma ACCUSPIN System-HISTOPAQUE-1077 (cat# A7054) sử dụng quy trình được cung cấp bởi nhà sản xuất. Lớp PBMC được thu hoạch và được rửa bằng 1x muối đệm phosphat (PBS) như được đề xuất bởi Sigma. PBMC được đếm và @ 1x10⁶/ml được tạo huyền phù cuối cùng trong RPMI (corning cat# 10-041-CV) được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS) (Gibco cat# 20140,79). 1ml tế bào (1x10⁶) được chuyển vào ống thử nghiệm Falcon 5mL Polypropylen đáy hình tròn (cat#352063) và được kích thích bằng các nồng độ khác nhau (0, 0,1, 1, 10 uM) trong 24 giờ trong tủ ấm CO₂ 5% ở 37°C.

Sau 24 giờ ủ, các ống được quay ly tâm ở tốc độ 1400 vòng/phút trong 5 phút và dịch nổi được thu hoạch. Dịch nổi được bảo quản ở -80°C để cho phép đo IFNβ tiếp theo. Phép đo IFNβ được thực hiện bằng cách sử dụng kit IFN-β Base của người (Meso Scale Diagnostics cat# K151ADA) và quy trình được cung cấp bởi nhà sản xuất được sử dụng. Việc ước tính IFN-beta được thực hiện bằng cách đọc đĩa thử nghiệm tại MESO SECTOR Imager 2400 và sử dụng chương trình MSD Discovery Workbench 4.0. Sau 24 giờ, protein IFNβ được phân tích. Các kết quả đã cho thấy hợp chất 1a có thể cảm ứng quá trình sản xuất PBMC IFNβ người sơ cấp theo cách phụ thuộc vào liều lượng.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10 phản ánh giá trị trung bình của các phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng năm đối tượng cho khác nhau.

Bảng 10. Thử nghiệm sự kích thích PBMC người *ex vivo*

	PBS (Đối chứng)	Hợp chất 1a		
		0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
IFN β (pg/mL)	0	21,3 $\pm$ 17,8	227,5 $\pm$ 62,4	540,2 $\pm$ 215,0

Để định lượng ARN thông tin IFN β (IFN β mRNA), tổng ARN được phân lập bằng cách sử dụng kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. IFN β mRNA được định lượng bằng thử nghiệm qPCR. Tóm lại, tổng ARN (400 ng đến 1000 ng) được chuyển hóa thành ADN bổ sung (cADN) trong thể tích phản ứng 60 μ l bằng cách sử dụng SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies, USA). Các cADN thu được (10 ng) sau đó được khuếch đại bằng cách sử dụng thử nghiệm biểu hiện Applied Biosystems TaqMan sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu ARN cho IFNB1 (Hs01077958_s1), và GAPDH (Hs99999905_m1). Phân tích qPCR được thực hiện bằng TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, USA) trên hệ thống PCR thời gian thực Applied Biosystems Quantstudio 12K Flex, với bước đầu tiên 2 phút ở 50°C, tiếp theo là 95°C trong 2 giây và 40 chu kỳ 95°C trong 1 giây và 60°C trong 20 giây. Mức biểu hiện gen tương đối được tính sau bước chuẩn hóa so với gen tham chiếu GAPDH bằng cách sử dụng phương pháp $2^{-\Delta\Delta CT}$. Các phép tính được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Applied Biosystems Quantstudio 12K Flex v1.2.2. Mức thay đổi số lần IFN β mRNA so với mẫu được xử lý bằng tá dược lỏng được tổng hợp trong Bảng 11. Các kết quả cho thấy rằng hợp chất 1a có thể cảm ứng IFN β mRNA trong PBMC sơ cấp theo cách phụ thuộc vào liều lượng và thời gian. Bảng 11 thể hiện giá trị trung bình được tính từ năm đối tượng cho khác nhau.

Bảng 11 – Thử nghiệm sự kích thích 3 giờ và 24 giờ PBMC người *ex vivo* (mRNA)

IFN β mRNA (mức thay đổi số lần so với mẫu được xử lý bằng tá dược lỏng)	Hợp chất 1a		
	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
Xử lý trong 3 giờ	51,0 $\pm$ 21,7	219,8 $\pm$ 69,8	1973,3 $\pm$ 1023,0
Xử lý trong 24 giờ	28,1 $\pm$ 28,9	10652,3 $\pm$ 4992,4	24157,3 $\pm$ 9224,2

Ví dụ 108 -- Hiệu quả chống ung thư của hợp chất 1a trên mẫu khối u kép CT26

Hợp chất 1a được thử nghiệm về hoạt tính chống ung thư trong mẫu khối u kép CT26, là mẫu bệnh ung thư ruột kết ở chuột nhắt. Chuột cái Balb/cJ 5-6 tuần tuổi (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) được cấy dưới da với các tế bào khối u CT26 ở cả hai bên của mỗi con chuột, 10^5 tế bào cho mỗi bên. Đối với nghiên cứu A, việc điều trị được bắt đầu 5 ngày (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg và 5 mg/kg) sau khi cấy khối u, khi các khối u trung bình đạt khoảng 100 mm^3 . Đối với nghiên cứu B, việc điều trị được bắt đầu 8 ngày (0,6 mg/kg, và 10 mg/kg) sau khi cấy khối u, khi các khối u trung bình đạt khoảng 120 mm^3 . Sơ đồ điều trị được mô tả trong Bảng 12 và Bảng 13.

Bảng 12. Phác đồ dùng liều cho nghiên cứu A

Nhóm	Số con chuột	Điều trị	Đường dùng và phác đồ
A	6	Tá dược lỏng (1 x PBS)	I.T.*; liều đơn
B	6	5 mg/kg hợp chất 1a	I.T.; liều đơn
C	6	2,5 mg/kg hợp chất 1a	I.T.; liều đơn
D	6	1,25 mg/kg hợp chất 1a	I.T.; liều đơn

*I.T. là trong khối u.

Bảng 13. Phác đồ dùng liều cho nghiên cứu B

Nhóm	Số con chuột	Điều trị	Đường dùng và phác đồ
A	5	Tá dược lỏng (1 x PBS)	I.T.*; liều đơn
B	5	10 mg/kg hợp chất 1a	I.T.; liều đơn
C	5	0,6 mg/kg hợp chất 1a	I.T.; liều đơn

*I.T. là trong khối u.

Tất cả các con chuột trong nghiên cứu này có hai khối u CT26 dưới da. “Khối u được điều trị” để chỉ khối u được dùng trực tiếp hợp chất, trong khi “khối u không được điều trị” để chỉ khối u không được dùng hợp chất trực tiếp. Thử nghiệm được theo dõi xuyên suốt thí nghiệm. Thử nghiệm khối u được đo hai lần một tuần sau khi bắt đầu điều trị. Kích thước khối u được tính từ các phép đo bằng thước kẹp theo công thức tính thể

tích của hình elip thon dài $(L \times W^2)/2$ trong đó L và W là các giá trị đo chiều dài và chiều rộng trực giao tương ứng (mm).

Hợp chất 1a đã cho thấy hoạt tính tiềm năng và cứu chữa trong mô hình khối u kép CT26 (FIG. 7 và FIG. 8). Đối với các khối u được điều trị, tỷ lệ cứu chữa 20% được phát hiện thậm chí ở liều dùng thấp nhất được thử nghiệm trong nghiên cứu này (Fig. 8, liều dùng 0,6 mg/kg). Đồng thời, liều dùng cao nhất (10 mg/kg) cứu chữa được 100% số con chuột có khối u đó ở cuối nghiên cứu. Đối với các khối u không được điều trị, hiệu quả kháng khối u phụ thuộc vào liều lượng cũng thể hiện rõ rệt. Nhóm dùng liều cao (10 mg/kg) đã cho thấy hiệu quả cứu chữa là 80%; tất cả các liều dùng thấp hơn cũng đã cho thấy hoạt tính ức chế sự phát triển khối u. Do đó, đã quan sát thấy ngưỡng điều trị nằm trong khoảng từ 0,6 mg/kg đến 10 mg/kg đối với hợp chất 1a, với hoạt tính kháng khối u không chỉ được quan sát thấy khu trú mà cả nội hấp, dựa trên các hiệu quả tại vị trí khối u ở xa không được tiêm. Kết luận, các kết quả này chỉ ra rằng sử dụng khu trú hợp chất 1a có thể cảm ứng cả hoạt tính chống ung thư khu trú và nội hấp (hiệu ứng abscopal - hiệu ứng ngoài mục tiêu).

Ví dụ 109 -- Hiệu quả chống ung thư của hợp chất 1a trên mẫu ung thư gan di căn CT26

Hợp chất 1a được thử nghiệm về hoạt tính kháng khối u của nó ở mẫu ung thư gan di căn CT26. Chuột cái BALB/cJ 5-6 tuần tuổi được gây mê (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) được cấy vào trong lách các tế bào khối u CT26 biểu hiện luxiferaza (5×10^5 tế bào mỗi con chuột). Một khoảng thời gian đợi mười phút sau đó cho phép tế bào khối u lưu thông vào trong gan của các con chuột. Sau đó, lách được loại bỏ và các con chuột được khâu và để phục hồi. Ba ngày sau, các tế bào khối u CT26 (10^5 tế bào mỗi con chuột) được cấy lại, lần này là dưới da (sc) dưới vùng chi trước bên phải, để cho phép phát triển kích thước khối u để sử dụng hợp chất. Chín ngày sau khi tiêm vào lách, hợp chất (10 mg/kg) được dùng trong khối u, một lần, vào khối u dưới da.

Hiệu quả chống ung thư khu trú của hợp chất được đo thông qua hiệu quả của nó trên khối u khi được dùng dưới da, trong khi hiệu ứng ngoài mục tiêu của hợp chất được đánh giá bằng tổng mức sống sót của các con chuột được điều trị so với các con chuột đối chứng được điều trị bằng tá dược lỏng, dựa trên hiệu quả bất lợi của kích thước khối u đang sinh trưởng trong mỗi gan của chuột. Hợp chất 1a đã cho thấy hoạt tính tiềm năng hướng đến các khối u dưới da khu trú và như hoạt tính hệ thống cứu chữa ở 9 trong

số 10 con vật được điều trị (FIG. 9). Các kết quả này chỉ ra rằng việc dùng khu trú hợp chất 1a có thể cảm ứng cả hoạt tính chống ung thư khu trú và nội hấp (hiệu ứng abscopal - hiệu ứng ngoài mục tiêu) bao gồm các tổn thương sâu như trong gan.

Ví dụ 110 -- Hiệu quả chống ung thư của hợp chất 1a trên mô hình não trực hướng GL261

Hợp chất 1a được thử nghiệm về hoạt tính chống ung thư ở mô hình não trực hướng GL261. GL261 là dòng tế bào u thần kinh đệm của chuột nhắt. Các tế bào u thần kinh đệm của chuột nhắt GL261 biểu hiện luxiferaza (2×10^4 tế bào/con chuột) được cấy trong sọ não của chuột nhắt cái bạch tạng B6 5-6 tuần tuổi (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine). Ba đến 4 ngày sau, các tế bào GL261 được cấy dưới da (10^6 tế bào/con chuột) dưới vùng chân trước bên phải để cho phép phát triển kích thước khối u để sử dụng hợp chất. Mười ngày sau khi cấy tế bào khối u trong sọ não, hợp chất (10 mg/kg) được sử dụng trong khối u, một lần, vào khối u dưới da. Hiệu quả chống ung thư khu trú của hợp chất được đo thông qua hiệu quả của nó đối với khối u dưới da, trong khi hiệu ứng ngoài mục tiêu của hợp chất được đánh giá bằng mức sống sót tổng số của chuột được điều trị so với chuột đối chứng được điều trị bằng tá dược lỏng, dựa trên hiệu quả bất lợi của kích thước khối u đang phát triển trong mỗi não chuột nhắt. Hợp chất 1a thể hiện hoạt tính tiềm năng tại các khối u khu trú dưới da và thể hiện hoạt tính cứu chữa nội hấp ở 5 trong số 8 con chuột được điều trị (FIG. 10). Các kết quả này chỉ ra rằng việc sử dụng khu trú hợp chất 1a có thể cảm ứng cả hoạt tính chống ung thư khu trú lẫn nội hấp (hiệu ứng abscopal - hiệu ứng ngoài mục tiêu) bao gồm các tổn thương sâu như trong não.

Ví dụ 111 – Cấu trúc tia X xác minh phức hợp với WT STING

Để hiểu hơn về cơ chế liên kết đích của các hợp chất mới, cấu trúc tinh thể tia X của WT STING trong phức hợp với các hợp chất được xác định.

A. Biểu hiện và tinh chế đầu tận cùng C của WT STING (gốc 155-341)

Trình tự ADN mã hóa protein WT STING người từ axit amin 155 đến 341 (SEQ ID NO: 4) được tách dòng vào vector pET21b, tiếp theo là thẻ His-TEV-Sumo tại đầu tận cùng N của nó (SEQ ID NO: 5). Trình tự của pET21b đã được nộp lưu tại addgene và sẵn có tại: addgene.org/vector-database/2550/; trình tự đó được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Các tế bào cộng codon *E. coli* BL21 (DE3) được biến nạp bằng plasmid này, và sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được cảm ứng bằng Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) 0,1 mM. Protein được tinh chế từ phân đoạn hòa tan của chất dung giải tế bào bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. Thở His-TEV-Sumo được loại bỏ bằng sumo proteaza, và được tách khỏi WT STING 155-341 không có thẻ, bằng cách sử dụng cột ái lực Ni-NTA thứ hai. Protein này còn được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion và loại trừ kích cỡ, và được bảo quản trong dung dịch đệm chứa Tris·HCl 20 mM pH 7,5, và NaCl 150 mM ở nồng độ 35 mg/ml.

B. Kết tinh và xác định cấu trúc của đầu tận cùng C của WT STING trong phức hợp với Hợp chất 1

Để đồng kết tinh WT STING 155-341, với Hợp chất 1, protein WT STING được pha loãng đến 10 mg/ml bằng các sử dụng dung dịch đệm bảo quản (Tris·HCl 20 mM pH 7,5, và NaCl 150 mM) và được trộn với Hợp chất 1 (dung dịch gốc 100 mM trong DMSO) với tỷ lệ mol 1:5. Hỗn hợp này được ủ trong 4 giờ ở 4°C, và được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 20 phút trước khi kết tinh. Các khay sàng lọc kết tinh được cài đặt bằng cách sử dụng phương pháp khuếch tán hơi giọt treo ở 18°C. Tinh thể được phát triển bằng cách trộn 1 μ L chứa dung dịch WT STING/Hợp chất 1 với thể tích của dung dịch trong giếng bằng nhau, chứa HEPES 100 mM pH 7,5, CaCl₂ 200 mM, và PEG 8000 15% (khối lượng/thể tích). PEG 400 20% (khối lượng/thể tích) được sử dụng làm chất phản ứng bảo vệ cryo khi tinh thể được làm đông nhanh trong nitơ lỏng. Các bộ dữ liệu nhiễu xạ được thu thập bằng máy dò Pilatus tại đường chùm tia SSRF BL19U1, và được xử lý bằng HKL3000 và chương trình SCALEPACK2MTZ trong bộ ứng dụng tích hợp CCP4.

Cấu trúc của WT STING 155-341 được liên kết với Hợp chất 1 được xác định bởi sự thay thế phân tử bằng cách sử dụng chương trình PHASER (Sự thay thế phân tử thống kê hợp lý cực đại), với PDB ID 4F9E là mô hình tra cứu ban đầu. Sự có mặt của Hợp chất 1 giữa giao diện dime của WT STING được xác định trong bản đồ sai khác Fo-Fc được tính với các pha mô hình. Mô hình được xây dựng và hoàn thiện thủ công bằng chương trình Coot và được tinh chỉnh bằng chương trình Refmac5 trong bộ ứng dụng tích hợp CCP4. Cấu trúc được tinh chỉnh cuối cùng được báo cáo tại độ phân giải 2,38 Å trong nhóm không gian P212121 với tế bào đơn vị được đo tại $a = 33,820$, $b = 78,110$, $c = 132,212$, $\alpha = 90,00$, $\beta = 90,00$, $\gamma = 90,00$. Hai bản sao của WT STING 155-

341 được xác định trong mỗi đơn vị không đối xứng liên kết với một phân tử của Hợp chất 1 tại giao diện dime.

C. Tương tác của Hợp chất 1 với WT STING quan sát được trong cấu trúc tinh thể tia X

FIG. 11 thể hiện hình ảnh cấu trúc tinh thể tia X của WT STING người trong phức hợp với Hợp chất 1. Tác giả sáng chế đã xem xét cấu trúc tinh thể tia X của WT STING người trong phức hợp với Hợp chất 1, mà được đồng kết tinh từ mẫu của Hợp chất 1a. Hợp chất liên kết tại túi giao diện được tạo thành bởi dime của protein WT STING. Hai mặt của bazơ adenin của hợp chất tạo thành tương tác xếp chồng π - π lần lượt với Tyr240 và nhóm guanidin của Arg238. Cầu liên kết trans olefin tạo thành tương tác van der Waals với phần béo của chuỗi bên của Arg 238. Nhóm thế flo tại vị trí C2' của nhóm riboza của các tổ hợp chất trong lỗ kỵ nước được xác định bởi Thr263, Pro264 và Tyr163. Nhóm thiophosphat tích điện âm của hợp chất tạo thành cầu muối với Các tương tác Arg238 và liên kết H lần lượt với Ser162 và Thr267. Ngoài ra, nhóm thiophosphat cũng tạo thành tương tác tĩnh điện với nhóm guanidin của Arg 232. Vùng vòng LID của WT STING, gồm gốc 226 đến 243, bao xung quanh hai nhóm bazơ và cầu nối trans olefin.

Ví dụ 112 – Xác định cấu trúc tinh thể tia X của REF STING trong phức hợp với Hợp chất 1.

A. Biểu hiện và tinh chế đầu tận cùng C của REF STING (gốc 155-341, SEQ ID NO: 6)

Trình tự ADN mã hóa protein REF STING người từ axit amin 155 đến 341 (SEQ ID NO: 6) được tách dòng vào vector pET21b, tiếp theo là thẻ His-TEV-Sumo tại đầu tận cùng N của nó (SEQ ID NO: 7). Trình tự của pET21b đã được nộp lưu tại addgene và sẵn có tại: addgene.org/vector-database/2550/; trình tự đó được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Các tế bào cộng codon *E. coli* BL21 (DE3) được biến nạp bằng plasmit này, và sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được cảm ứng bằng Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) 0,1 mM. Protein được tinh chế từ phân đoạn hòa tan của chất dung giải tế bào bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. Thẻ His-TEV-Sumo được loại bỏ bằng sumo proteaza, và được tách khỏi REF STING₁₅₅₋₃₄₁ không có thẻ bằng cách sử

dụng cột ái lực Ni-NTA thứ hai. Protein này còn được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion và loại trừ kích cỡ, và được bảo quản trong dung dịch đệm chứa Tris·HCl 20 mM pH 7,5, và NaCl 150 mM ở nồng độ 24 mg/ml.

B. Kết tinh và xác định cấu trúc của đầu tận cùng C của REF STING trong phức hợp với Hợp chất 1

Để đồng kết tinh REF STING 155-341, với Hợp chất 1, protein REF STING được pha loãng đến 10 mg/ml bằng các sử dụng dung dịch đệm bảo quản (Tris·HCl 20 mM pH 7,5, và NaCl 150 mM) và được trộn với Hợp chất 1 (dung dịch gốc 100 mM trong DMSO) với tỷ lệ mol 1:5. Hỗn hợp này được ủ trong 4 giờ ở 4°C, và được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 20 phút trước khi kết tinh. Các khay sàng lọc kết tinh được cài đặt bằng cách sử dụng phương pháp khuếch tán hơi giọt treo ở 18°C. Tinh thể được phát triển bằng cách trộn 1 μ L chứa dung dịch REF STING/Hợp chất 1 với thể tích của dung dịch trong giếng bằng nhau, chứa HEPES 100 mM pH 7,5, CaCl₂ 200 mM, và PEG 8000 15% (khối lượng/thể tích). PEG 400 20% (khối lượng/thể tích) được sử dụng làm chất phản ứng bảo vệ cryo khi tinh thể được làm đông nhanh trong nitơ lỏng. Các bộ dữ liệu nhiễu xạ được thu thập bằng máy dò Pilatus tại đường chùm tia SSRF BL18U1, và được xử lý bằng HKL3000 và chương trình SCALEPACK2MTZ trong bộ ứng dụng tích hợp CCP4. Cấu trúc này được thể hiện trên FIG. 12.

Cấu trúc của REF STING_155-341, được liên kết với Hợp chất 1 được xác định bởi sự thay thế phân tử bằng cách sử dụng chương trình PHASER (Sự thay thế phân tử thống kê hợp lý cực đại), sử dụng cấu trúc WT STING 155-341 đã được xác định trước đó (như được mô tả trên đây) là mô hình tra cứu ban đầu. Sự có mặt của Hợp chất 1 giữa giao diện dime của REF STING được xác định trong bản đồ sai khác Fo-Fc được tính với các pha mô hình. Mô hình này được xây dựng và hoàn thành thủ công bằng chương trình Coot và được tinh chỉnh bằng chương trình Refmac5 trong bộ ứng dụng tích hợp CCP4. Cấu trúc được tinh chỉnh cuối cùng được báo cáo tại độ phân giải 2,76 Å trong nhóm không gian P212121 với tế bào đơn vị được đo tại $a = 33,733$, $b = 77,831$, $c = 131,689$, $\alpha = 90,00$, $\beta = 90,00$, $\gamma = 90,00$. Hai bản sao của REF STING 155-341 được xác định trong mỗi đơn vị không đối xứng liên kết với một phân tử của Hợp chất 1 tại giao diện dime.

C. Tương tác của Hợp chất 1 với REF STING quan sát được trong cấu trúc tinh thể tia X

FIG. 12 thể hiện cấu trúc tinh thể tia X của REF STING trong phức hợp với Hợp chất 1, mà được đồng kết tinh từ mẫu của Hợp chất 1a. Hợp chất liên kết tại túi giao diện được tạo thành bởi dime của protein STING. Hai mặt của bazơ adenin của hợp chất tạo thành tương tác chồng lớp π - π lần lượt với Tyr240 và nhóm guanidin của Arg238. Cầu nối trans olefin tạo thành tương tác van der Waals với phần béo của chuỗi bên của Arg238 trong khi phần guanidin của chuỗi bên của Arg238 tạo thành tương tác chồng lớp π - π với nhóm imidazol của chuỗi bên của His232 từ phía ngoài. Cầu nối olefin tiếp xúc với cặp tương tác của các chuỗi bên của Arg238 và His232. Nhóm thế flo tại vị trí C2' của nhóm riboza của các tổ hợp chất trong lỗ kỵ nước được xác định bởi Thr263, Pro264 và Tyr163. Nhóm thiophosphat tích điện âm của hợp chất tạo thành cầu muối với Các tương tác Arg238 và liên kết H lần lượt với Ser162 và Thr267. Vùng vòng LID của REF STING, gồm gốc 226 đến 243, bao xung quanh hai nhóm bazơ và cầu nối trans olefin.

Ví dụ 113 – So sánh

Giá trị EC50 được tính cho các thử nghiệm STING người của WT STING, HAQ STING, AQ STING, và REF STING, trong sự so sánh đôi đầu bằng cách sử dụng Hợp chất 1a theo sáng chế, phối tử STING tự nhiên (2'3' cGAMP), và chất chủ vận STING có mục đích ML RR-S2 CDA, như được báo cáo trong Corrales, *et al.*, "Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity," *Cell Reports* (2015) 11:1018-1030, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Các thử nghiệm được thực hiện như được mô tả trong các ví dụ nêu trên. Lưu ý rằng các giá trị trong thử nghiệm đã được báo cáo trong Bảng 14 được giới hạn ở các thử nghiệm được thực hiện trong các so sánh đôi đầu và có thể không phản ánh các giá trị trung bình được xác định qua số lượng thử nghiệm lớn hơn như được báo cáo trong Bảng 5 hoặc phần mô tả khác. Lưu ý thêm rằng "2'3' cGAMP" giống như "ML cGAMP" như được báo cáo trong ấn phẩm *Cell Reports*.

Bảng 14

Hợp chất	Kd (WT) (μ M)	EC ₅₀ người (mM) (thử nghiệm 20 giờ)			
		WT	HAQ	AQ	REF
2'3' cGAMP	0,07	61,7	57,9	56,5	33-100
ML RR-S2 CDA	0,4	5,9	8,4	5,5	>100
Hợp chất 1a	0,04	0,6	1,9	1,0	3,9

Bảng 14 cũng báo cáo các hằng số liên kết phân ly (Kd) cho liên kết của WT STING người với mỗi hợp chất trong số ba hợp chất được thử nghiệm, như được đo bằng phép đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt (isothermal titration calorimetry - ITC). ITC là kỹ thuật chuẩn độ vi nhiệt lượng để đo các tính chất nhiệt động học liên quan đến các tương tác nội phân tử. Dựa vào các thử nghiệm này, Hợp chất 1a dường như tạo thành liên kết mạnh nhất với WT STING của các hợp chất được thử nghiệm.

Vật liệu

Protein STING kiểu đại của người tái tổ hợp (aa, 139-379, H232R) được tạo ra bằng cách biểu hiện cấu trúc trong *E. coli* mã hóa miền dung dịch bào tương của WT STING người bao gồm các axit amin 139-379.

Chất phản ứng

Các nguồn chất phản ứng được sử dụng trong nghiên cứu này được thể hiện dưới đây:

Chất phản ứng	Nguồn	Số danh mục
1X PBS không có canxi hoặc magie	Corning	21-040-CV
Nước khử ion MilliQ	MilliQ	Z000Q0V0T0
Liquinox	Alconox	1201
NaOH	EM	SXO593-1
Metanol	EMD Millipore	MX0475-1
Các hợp chất: Hợp chất 1a		

2'3' cGAMP	
ML RR-S2 CDA	

Điều chế dung dịch đậm protein

Protein STING được bảo quản ở -60°C trong các phần phân ước 90 μL và 100 μL , mỗi phần này ở nồng độ lần lượt là 3,0 mg/mL và 20 mg/mL trong PBS, độ pH 7,5 chứa glycerol 5%. Vào ngày phân tích, các phần phân ước của protein này được rã đông, được pha loãng đến 400 μL và được trao đổi dung dịch đậm thành PBS bằng cách sử dụng bộ lọc ly tâm Amicon Ultra (ngắt mạch 10k MW, 0,5 mL) với ít nhất bốn lần ly tâm 10 phút ở tốc độ $14000 \times g$ với thiết bị vi ly tâm Eppendorf và sau đó được pha loãng cuối cùng đến nồng độ nằm trong khoảng từ 20 μM đến 30 μM (phụ thuộc vào thí nghiệm) bằng 1X PBS. Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng quang phổ kế Nanodrop 2000 và hệ số tắt protein là $22140 (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$.

Điều chế mẫu

Hai trăm μL chứa các dung dịch gốc 1 mM của Hợp chất 1a, 2'3' cGAMP, và ML RR-S2CDA được cung cấp bởi các ống vi ly tâm 1,5 mL. Trước mỗi thí nghiệm, các mẫu này được pha loãng đến các nồng độ nằm trong khoảng từ 200 μM đến 500 μM (phụ thuộc vào thí nghiệm).

Phương pháp

Các thử nghiệm được thực hiện trên bộ ITC ái lực (TA Instruments số 609003.901) được trang bị bộ phận làm sạch ITC (TA Instruments số 601800.901). Dung dịch protein STING, khoảng 400 μL chứa trong khoảng từ 20 μM đến 30 μM protein STING, được hút bằng pipet vào ô của máy đo nhiệt lượng 185 μL cho phép một số mức quá tải chấp nhận được. Ô tham chiếu chứa lượng nước Milli-Q tương đương. Quá trình ủ được thực hiện ở 25°C với 20 lần tiêm 2,5 μL của các hợp chất có nồng độ nằm trong khoảng từ 100 μM đến 300 μM . Phần mềm điều khiển là ITC Run Ver. 3.3.0.0 (TA Instruments) được sử dụng để thu được nhiệt độ gồm nhiều đỉnh của nhiệt thô ($\mu\text{cal/giây}$) thể hiện tốc độ nhiệt tại từng lần tiêm. Phần mềm phân tích là Nano Analyze Ver. 3.70 (TA Instruments) được sử dụng để hiệu chỉnh đường cơ sở, hiệu chỉnh cho khoảng trắng hoặc nhiệt mẫu của dung dịch pha loãng (tại điểm bão hòa) và

để hợp nhất các đỉnh tốc độ nhiệt tạo ra các giá trị “Q” được lập đồ thị. Các đường đẳng nhiệt thu được được làm phù hợp với mô hình độc lập để suy ra các thông số nhiệt động học.

Các giá trị K_d và n (các tỷ lệ mol tại các điểm uốn của đường cong) được suy ra và báo cáo. Các điều kiện tối ưu cho các nồng độ protein và phối tử được suy ra từ các thí nghiệm sơ bộ.

Kết quả

Các nhiệt đồ tốc độ nhiệt và các đường đẳng nhiệt tạo thành của chúng để liên kết các hợp chất được thử nghiệm với STING kiểu đại của người tái tổ hợp (aa, 139-379, H232R) được xác định. Liên kết của từng hợp chất với STING là thu nhiệt như được chỉ ra bởi các tốc độ nhiệt âm với nhiệt tỏa nhiệt (theo chiều dương) của dung dịch pha loãng (quan sát được sau khi hợp chất đạt được trạng thái bão hòa của protein). Đã cho thấy 2', 3' cGAMP tạo ra sự đáp ứng thu nhiệt tương tự với các biến thể STING khác nhau. Hợp chất 1a cung cấp K_d thấp nhất là 0,04 μM , tiếp theo là 2'3' cGAMP với K_d là 0,07 μM và sau đó là ML RR-S2 CDA với K_d là 0,40 μM . Tất cả các hợp chất cung cấp các giá trị n gần bằng 0,5, cho thấy rằng protein STING có mặt dưới dạng dimer và liên kết 1 mol của hợp chất trên mỗi 2 mol STING.

Ví dụ 114 – Xác định các chất chuyển hóa tiềm năng

Hợp chất 1a được ủ trong các tế bào gan của chuột nhắt CD-1, chuột đồng Sprague Dawley, chó Beagle, khỉ Cynomolgus, và người, để đánh giá sự hình thành các chất chuyển hóa chính.

Vật liệu

Các tế bào gan được bảo quản cryo được đặt hàng từ ThermoFisher Scientific (Waltham, MA), Xenotech, LLC (Kansas City, KS) và In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD), và các môi trường thích hợp được đặt từ In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD) và Life Technologies (Carlsbad, CA). Dung dịch nhuộm AOPI và dung dịch đệm phosphat thu được lần lượt từ Corning Life Sciences (Tewksbury, MA) và Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA). Tất cả các hóa chất, chất phản ứng, và dung môi được sử dụng trong phân tích đạt tiêu chuẩn phân tích hoặc HPLC.

Thiết kế thí nghiệm và quy trình thí nghiệm

Nuôi cấy tế bào gan

Hợp chất 1a được cân và được hòa tan trong HPLC-nước chứa axit formic PBS 0,12% để tạo ra 1020 mmol/L. Sau đó, dung dịch này được pha loãng riêng rẽ 2,5 lần thành 4 mmol/L và sau đó được pha loãng tiếp 21000 lần bằng môi trường E của Williams chứa albumin huyết thanh người 0,1% và 2 mmol/L L-glutamin để thu được dung dịch xử lý gốc với nồng độ là 20 $\mu\text{mol/L}$.

Trước khi ủ, các tế bào gan được bảo quản cryo được rã đông trong bể nước ở 37°C. Một ống chứa các tế bào gan được bảo quản cryo được bổ sung vào từng ống hình nón dung tích 50 mL chứa môi trường phục hồi tế bào gan được bảo quản cryo (UCRM) thu được từ In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD). Các tế bào được quay ly tâm trong máy ly tâm Beckman (Brea, CA) với roto GH 3.8 ở tốc độ 740 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và các tế bào này được tái tạo huyền phù trong môi trường cấy trên đĩa để đếm tế bào. Sau khi các tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường cấy trên đĩa, 20 μL môi trường đã được tái tạo huyền phù được chuyển và trộn với 20 μL dung dịch nhuộm AOPI. Dung dịch này được trộn nhẹ và các tế bào được đếm bằng cách sử dụng máy đếm tế bào Cellometer (Nexcelom, Lawrence, MA). Sau khi đếm, các tế bào sau đó được tái tạo huyền phù ở nồng độ 1 hoặc 2 triệu tế bào sống sót/mL trong môi trường E của Williams chứa 2 mmol/L L-glutamin (độ pH 7,4).

Huyền phù tế bào gan (50 μL /giếng) được bổ sung vào đĩa 48 giếng. Năm mươi microlit dung dịch xử lý gốc chứa Hợp chất 1a (20 $\mu\text{mol/L}$) được bổ sung để bắt đầu phản ứng. Đĩa này được đặt vào tủ ủ nuôi cấy mô (khí quyển với độ ẩm CO₂ 5%/không khí 95% và 37°C), và phản ứng được kết thúc bằng 200 μL dung dịch ngừng gồm metanol/axetonitril 100% (1/1, thể tích/thể tích) với 2010 ng/mL furosemit và 0,2 $\mu\text{mol/L}$ (R)-propranolol tại 5, 30, 60, 120, 180 và 240 phút. Hỗn hợp này được ly tâm và được lọc, và dịch nổi được thu gom để phân tích. Nồng độ cuối của các tế bào gan được bảo quản cryo là 1×10^6 tế bào/mL. Nồng độ ủ cuối của Hợp chất 1a là 10 $\mu\text{mol/L}$.

Các điều kiện LC-MS/MS để xác định chất chuyển hóa

Hệ thống LC-MS/MS bao gồm Shimadzu HPLC và mạch tứ cực lai AB-SCIEX TripleTOF 5600 và khối phổ kế TOF (Framingham, MA). HPLC của Shimadzu (Kyoto,

Nhật Bản), gồm có mô-đun đường truyền thông (CBM-20A), dụng cụ lấy mẫu tự động (SIL-30AC) với bộ đổi máng được gắn (Rack Changer II) hai bơm (LC-30AD) và lò cột (CTO-30A). Khối phổ kế được hiệu chuẩn bằng cách sử dụng AB-SCIEX APCI cả dung dịch hiệu chỉnh âm và dương (Framingham, MA). Các mẫu thu được từ sự nuôi cấy tế bào gan được phân tích ở cả chế độ quét âm và dương. Phương pháp phân tích cơ bản và các điều kiện thiết bị được tổng hợp dưới đây. Việc cải biến các thông số cài đặt phổ kế phụ thuộc vào sự cần thiết của chất phân tích.

Điều kiện LC-MS/MS:

Thiết lập phép sắc ký:	Shimadzu LC30AD
Loại cột	Agilent Eclipse XDB-C8, 5 μ , 2,1x150mm, phần # 993700-906, sê-ri# USSN002817
Các pha động	A: nước/metanol = 95/5 (thể tích/thể tích) với 5 mM amoni axetat B: metanol/nước = 95/5 (thể tích/thể tích) với 5 mM amoni axetat
Gradient	0-1 phút tại 1%B; 1-5 phút tuyến tính đến 10%B; 5-13 phút tuyến tính đến 95%B; 13-19,9 phút tại 95%B; 19,9-20 phút tuyến tính đến 1%B; 20-24 phút tại 1% B
Tốc độ dòng:	0,4 mL/phút
Thời gian phân tích	24 phút
Nhiệt độ khay mẫu	4°C
Thể tích tiêm	15 μ L
Cài đặt quang phổ khối:	Mạch tứ cực lai AB Sciex-TOF LC-MS/MS Triple TOF 5600
Nguồn ion	Nguồn ion DuoSpray
Tính phân cực	Âm hoặc Dương
Điện áp phun ion (ISVF)	4500 V hoặc 5500 V
Nhiệt độ (TEM)	550°C
Khí màn (CUR)	30
GS1	50
GS2	50
Cài đặt TOF-MS:	CE -5,000 hoặc 5,000 DP -100,000 hoặc 100,000 Khoảng quét: 120,0 – 1000,0
Cài đặt TOF MS ² :	CE -60,000 hoặc 60,000 CES 5,000 DP -100,000 hoặc 100,000 Khoảng quét: 100,0 – 1000,0

Phân tích số liệu của số liệu hoạt tính

Số liệu quan phổ khối thu được bằng cách sử dụng phần mềm AB-Sciex Analyst TF (Phiên bản 1.5.1; Framingham, MA). Sắc phổ và quang phổ thu được bằng cách sử dụng AB-Sciex PeakView (Phiên bản 2.2.0.1; Framingham, MA). Phép so sánh các điện tích đỉnh tương đối cho sắc phổ ion đã được chiết được dựa trên $\pm 0,0002$ Da của tỉ lệ khối lượng so với điện tích chính xác được kỳ vọng (m/z) cho từng chất phân tích quan tâm.

Kết quả

Không phát hiện thấy chất chuyển hóa từ sự nuôi cấy tế bào gan. Trong các điều kiện phân tích được trình bày, Hợp chất 1a đã cho thấy thời gian giữ là khoảng 7,8 phút. Trong chế độ quét âm, Hợp chất 1a đã cho thấy ion phân tử đã được khử proton m/z 745 ($C_{24}H_{25}F_2N_{10}O_8P_2S_2^-$) và ion phân tử đã được khử proton hai lần m/z 372 ($C_{24}H_{24}F_2N_{10}O_8P_2S_2^{2-}$). Đã quan sát thấy các ion sản phẩm MS/MS chính với m/z 533 ($C_{19}H_{19}FN_{10}O_4PS^-$) và m/z 186 ($C_9H_8N_5^-$). Trong chế độ quét dương, Hợp chất 1a đã cho thấy phân tử đã được proton hóa m/z 747 ($C_{24}H_{27}F_2N_{10}O_8P_2S_2^+$) và ion sản phẩm MS/MS chính với m/z 651 ($C_{24}H_{26}F_2N_{10}O_6PS^+$), m/z 252 ($C_{10}H_{11}FN_5O_2^+$), và m/z 188 ($C_9H_{10}N_5^+$). MS và dữ liệu MS/MS xác nhận cấu trúc của Hợp chất 1a.

Hợp chất 1a ổn định trong quá trình ủ với tế bào gan của chuột nhắt, chuột đồng, chó, khỉ, và người. Không có sự chuyển hóa rõ ràng của Hợp chất 1a được xác định trong nghiên cứu này. Trong các mẫu thu được từ quá trình ủ với các tế bào gan, chỉ có chính Hợp chất 1a mới có thể được phát hiện và được xác nhận bằng các mảnh của phép đo khối phổ song song (MS/MS).

Tất cả các tài liệu được viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo, mặc dù nếu tài liệu được kết hợp bất kỳ mẫu thuẫn với bản mô tả này, thì bản mô tả này sẽ kiểm soát. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các thay đổi và các cải biến khác nhau có thể được thực hiện với các nguyên liệu được đề xuất ở đây, và các nguyên liệu đó cũng nằm trong phạm vi và tinh thần của sáng chế.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

SEQ ID NO: 1 (WT STING người):

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccaga
 aggcagccttggttctgctgagtgccctgcctgggtgaccctttgggggctaggagagcc
 accagagcacactctccggtacctgggtgctccacctagcctccctgcagctgggactg
 ctgttaaacgggggtctgcagcctggctgaggagctgcgccacatccactccaggtacc
 ggggcagctactggaggactgtgcgggcctgcctgggctgccccctccgccgtggggc
 cctgttgctgctgtccatctatcttctactactccctcccaaagtgcggctcgcccgccc
 ttcacttggtatgcttgccctcctgggcctctcgcaggcactgaacatcctcctggggc
 tcaagggcctggccccagctgagatctctgcagtggtgtgaaaaagggaatttcaacgt
 ggcccatgggctggcatgggtcatattacatcggatatctgcgggtgatcctgccagag
 ctccaggccccggattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacgggggtgcag
 tgagccagcggctgtatatcttctcctcccattggactgtgggggtgcctgataacctgag
 tatggctgaccccaacattcgcttcctggataaactgccccagcagaccgggtgaccgg
 gctggcatcaaggatcggggttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggc
 agcgggcgggcacctgtgtcctggagtacgccacccccttgccagactttgtttgccat
 gtcacaatacagtcagctggcttttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactc
 ttctgccggacacttgaggacatcctggcagatgccctgagctctcagaacaactgcc
 gcctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgtgtcccaggaggt
 tctccggcacctgcggcaggaggaaaaggagaggttactgtgggcagcttgaagacc
 tcagcgggtgccagtacctccacgatgtcccaagagcctgagctcctcatcagtggaa
 tggaaaagccccctccctctccgcacggatttctcttga

SEQ ID NO: 2 (REF STING người):

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccaga
 aggcagccttggttctgctgagtgccctgcctgggtgaccctttgggggctaggagagcc
 accagagcacactctccggtacctgggtgctccacctagcctccctgcagctgggactg
 ctgttaaacgggggtctgcagcctggctgaggagctgcgccacatccactccaggtacc
 ggggcagctactggaggactgtgcgggcctgcctgggctgccccctccgccgtggggc
 cctgttgctgctgtccatctatcttctactactccctcccaaagtgcggctcgcccgccc
 ttcacttggtatgcttgccctcctgggcctctcgcaggcactgaacatcctcctggggc
 tcaagggcctggccccagctgagatctctgcagtggtgtgaaaaagggaatttcaacgt
 ggcccatgggctggcatgggtcatattacatcggatatctgcgggtgatcctgccagag

ctccaggccccggattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacgggggtgcag
tgagccagcggctgtatatattctcctccattggactgtgggggtgcctgataacctgag
tatggctgacccaacattcgcttcctggataaactgccccagcagaccggtgaccat
gctggcatcaaggatcgggtttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggc
agcgggcgggcacctgtgtcctggagtagccaccccccttgacagactttgtttgccat
gtcacaatacagtcaagctggctttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactc
ttctgccggacacttgaggacatcctggcagatgcccctgagtctcagaacaactgcc
gcctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgctgtcccaggaggt
tctccggcacctgcggcaggaggaaaaggaagagggttactgtgggcagcttgaagacc
tcagcgggtgcccagtagctccacgatgtcccaagagcctgagctcctcatcagtggaa
tggaagagccccctccctctccgcacggatttctcttga

SEQ ID NO: 3 (AQ STING người):

atgccccactccagcctgcatccatccatcccgtgtcccaggggtcacggggcccaga
aggcagccttggttctgctgagtgcctgcctggtagccctttgggggctaggagagcc
accagagcacactctccggtacctgggtgctccacctagcctccctgcagctgggactg
ctgttaaacgggggtctgcagcctggctgaggagctgcgccacatccactccaggtacc
ggggcagctactggaggactgtgcgggcctgcctgggctgccccctccgccgtggggc
cctgttgctgctgtccatctatttctactactccctcccaaatgcgggtcggccccgcc
ttcacttggtatgcttgccctcctgggcctctcgcaggcactgaacatcctcctggggc
tcaagggcctggccccagctgagatctctgcagtgtgtgaaaaagggaatttcaacgt
ggcccatgggctggcatgggtcatattacatcggatatctgcggctgatcctgccagag
ctccaggccccggattcgaacttacaatcagcattacaacaacctgctacgggggtgcag
tgagccagcggctgtatatattctcctccattggactgtgggggtgcctgataacctgag
tatggctgacccaacattcgcttcctggataaactgccccagcagaccgctgaccga
gctggcatcaaggatcgggtttacagcaacagcatctatgagcttctggagaacgggc
agcgggcgggcacctgtgtcctggagtagccaccccccttgacagactttgtttgccat
gtcacaatacagtcaagctggctttagccgggaggataggcttgagcaggccaaactc
ttctgccagacacttgaggacatcctggcagatgcccctgagtctcagaacaactgcc
gcctcattgcctaccaggaacctgcagatgacagcagcttctcgctgtcccaggaggt
tctccggcacctgcggcaggaggaaaaggaagagggttactgtgggcagcttgaagacc
tcagcgggtgcccagtagctccacgatgtcccaagagcctgagctcctcatcagtggaa
tggaagagccccctccctctccgcacggatttctcttga

SEQ ID NO: 4 (WT STING các gốc 155-341):

VAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNL
SMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFA
MSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQE
VLRHLRQEEKEEV

SEQ ID NO: 5 (His-TEV-Sumo-WT STING 155-341)

MHHHHHHSSGVDLG TENLYFQSNAMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSE
IFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQ GKEMDSLRF LYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAH
REQIGGGSVAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPL
DCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDRAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYA
TPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADD
SSFSLSQEVLRHLRQEEKEEV

SEQ ID NO: 6 (REF STING các gốc 155-341):

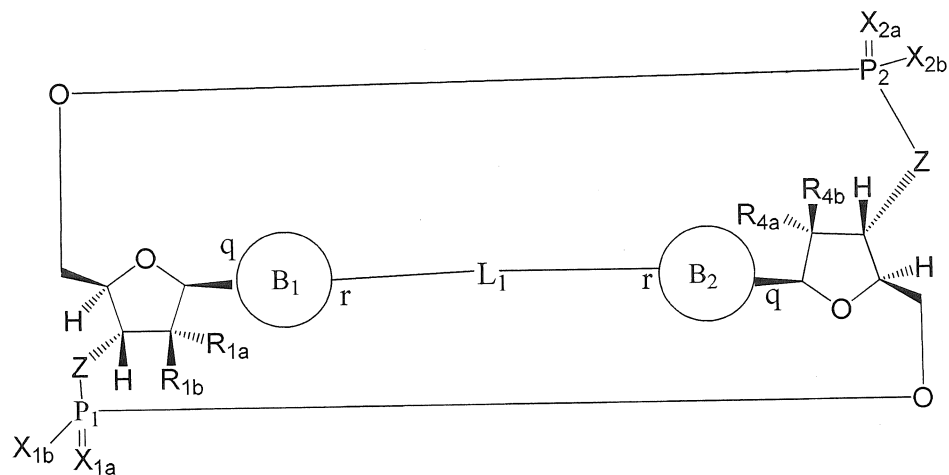
VAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNL
SMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFA
MSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQE
VLRHLRQEEKEEV

SEQ ID NO: 7 (His-TEV-Sumo-REF STING 155-341)

MHHHHHHSSGVDLG TENLYFQSNAMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSE
IFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQ GKEMDSLRF LYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAH
REQIGGGSVAHGLAWSYYIGYLRILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPL
DCGVDPNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYA
TPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADD
SSFSLSQEVLRHLRQEEKEEV

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có Công thức (III):



(III)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{1a} và R_{1b} là $-H$;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-OH$, và $-F$, trong đó ít nhất một trong số R_{4a} và R_{4b} là $-H$;

mỗi P_1 và P_2 độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

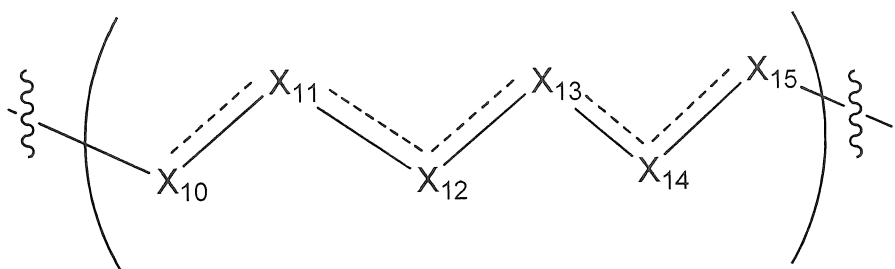
Z là $-O-$ hoặc $-NH-$;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $=O$ hoặc $=S$;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ $-OR_5$ và $-SR_5$;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, và $-CH_2OC(O)OC_{1-6}alkyl$;

L_1 trong công thức (III) có chiều dài bốn, năm, hoặc sáu cacbon, và là

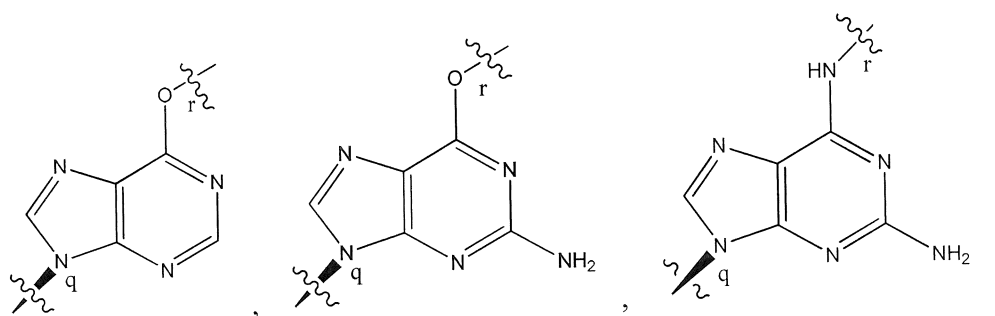


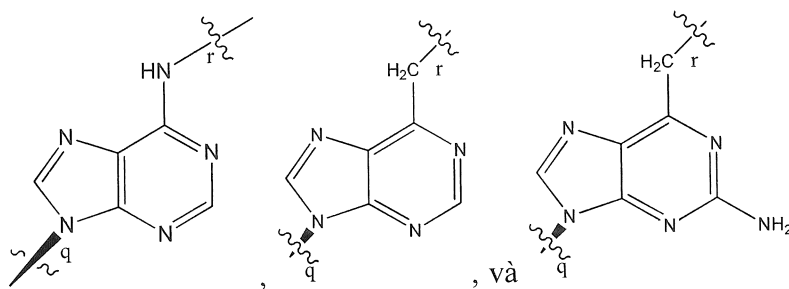
trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba và trong đó (i) 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba; hoặc (ii) 0, 1, hoặc 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về từng liên kết đôi là cis hoặc trans; và (iii) trong đó khi 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba, 0 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi; và (iv) trong đó, khi 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, các liên kết đôi này là các liên kết liền kề hoặc các liên kết xen kẽ;

trong đó X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} độc lập được chọn từ liên kết, $-\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{CH}-$, trong đó $-\text{CH}_2-$ hoặc $-\text{CH}-$ không được thế hoặc được thế bởi (i) $-\text{OH}$, (ii) $-\text{F}$, (iii) $-\text{Cl}$, (iv) $-\text{NH}_2$, hoặc (v) $-\text{D}$, và khi X_{10} hoặc X_{15} là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi hoặc liên kết ba;

và trong đó hai thành viên liền kề bất kỳ của nhóm bao gồm X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} có thể tùy ý tạo thành, với các nguyên tử bổ sung, C_3 xycloalkyl hoặc C_3 heteroxycloalkyl, C_3 heteroxycloalkyl này bao gồm nguyên tử N hoặc O;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:





trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B₁ và B₂ được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (III).

2. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm 1, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F, trong đó cả R_{1a} và R_{1b} có thể đều không phải là -F;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F, trong đó cả R_{4a} và R_{4b} có thể đều không phải là -F;

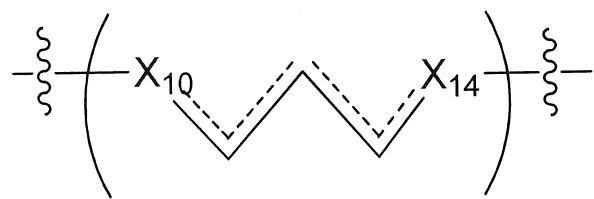
mỗi P₁ và P₂ độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ =O hoặc =S;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ -OR₅ và -SR₅;

trong đó R₅ được chọn từ nhóm bao gồm -H, C₁₋₆alkyl, và -C(O)C₁₋₆alkyl;

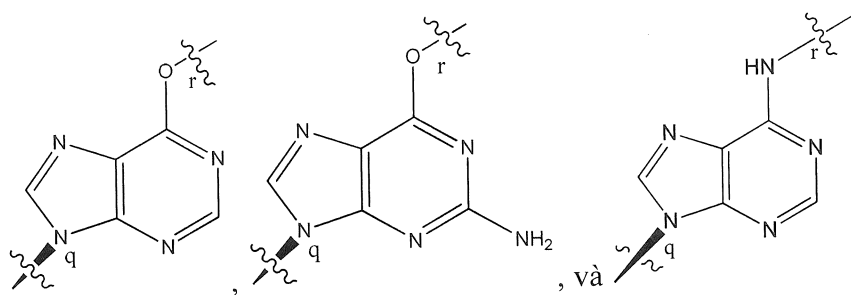
L₁ trong công thức (III) có chiều dài bốn hoặc năm cacbon, và là



trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi, và trong đó 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L₁ chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là cis hoặc trans;

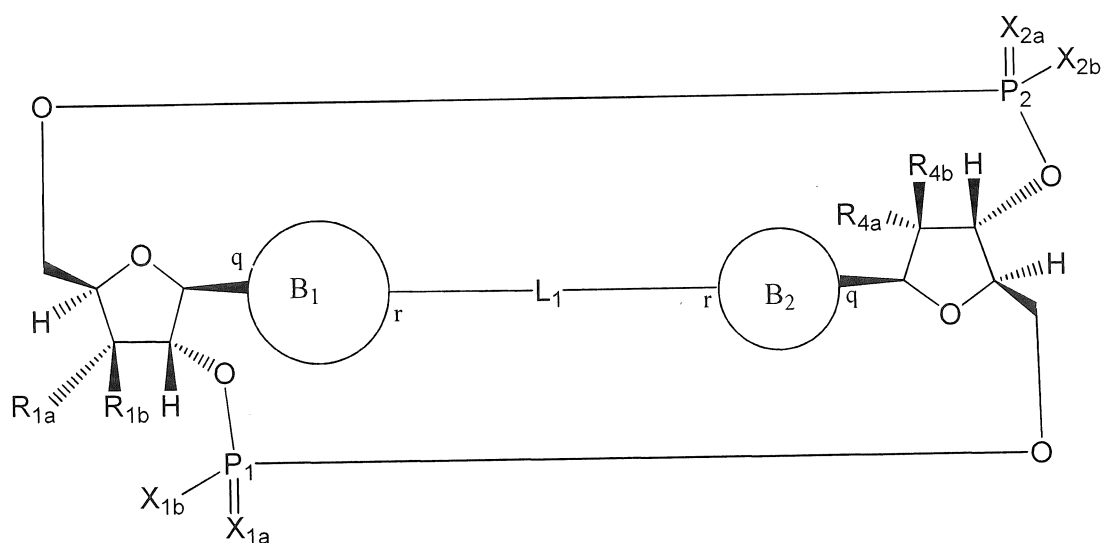
trong đó X₁₀ và X₁₄ độc lập được chọn từ liên kết, -CH-, hoặc -CH₂-, và trong đó, khi X₁₀ hoặc X₁₄ là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi;

trong đó B₁ và B₂ độc lập được chọn từ:



, trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B₁ và B₂ được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (III).

3. Hợp chất có Công thức (IV):



(IV)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F, trong đó ít nhất một trong số R_{1a} và R_{1b} là -H;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F, trong đó ít nhất một trong số R_{4a} và R_{4b} là -H;

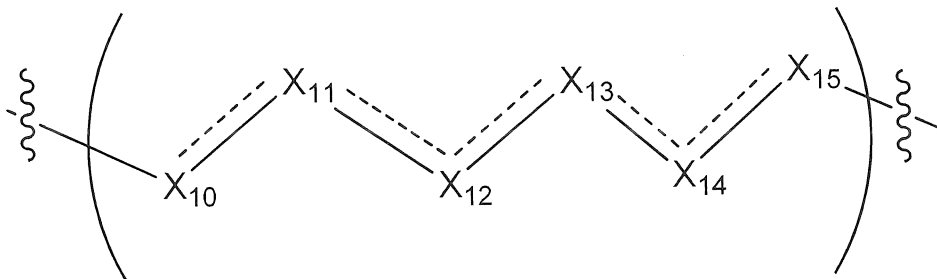
mỗi P₁ và P₂ độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ =O hoặc =S;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ -OR₅ và -SR₅;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{1-6}alkyl$, và $-CH_2OC(O)OC_{1-6}alkyl$;

L_1 trong công thức (IV) có chiều dài bốn, năm, hoặc sáu cacbon, và là

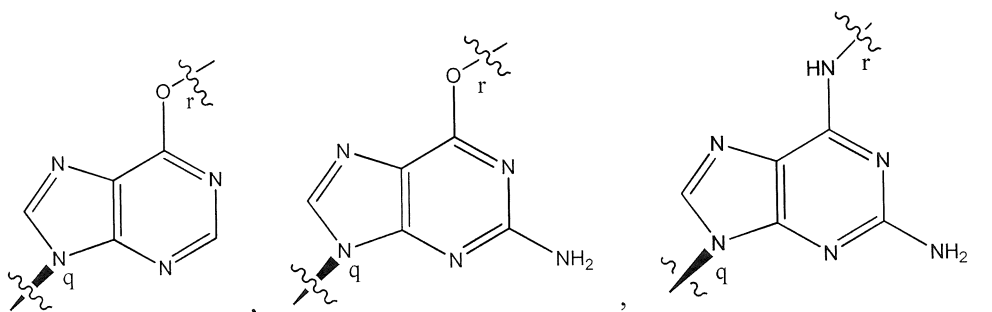


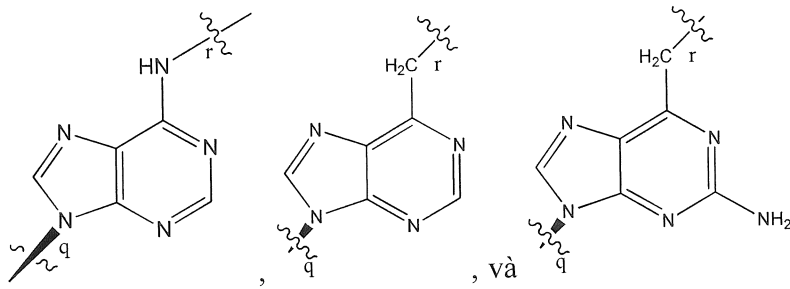
trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba và trong đó (i) 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba; hoặc (ii) 0, 1, hoặc 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về từng liên kết đôi là cis hoặc trans; và (iii) trong đó khi 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba, 0 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi; và (iv) trong đó, khi 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, các liên kết đôi này là các liên kết liên kề hoặc các liên kết xen kẽ;

trong đó X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} độc lập được chọn từ liên kết, $-CH_2-$, hoặc $-CH-$, trong đó $-CH_2-$ hoặc $-CH-$ không được thế hoặc được thế bởi (i) $-OH$, (ii) $-F$, (iii) $-Cl$, (iv) $-NH_2$, hoặc (v) $-D$, và khi X_{10} hoặc X_{15} là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi hoặc liên kết ba;

và trong đó hai thành viên liên kề bất kỳ của nhóm bao gồm X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} có thể tùy ý tạo thành, với các nguyên tử bổ sung, C_3 xycloalkyl hoặc C_3 heteroxycloalkyl, C_3 heteroxycloalkyl này bao gồm nguyên tử N hoặc O;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:





trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B₁ và B₂ được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (IV)

hoặc trong đó

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F, trong đó cả R_{1a} và R_{1b} có thể đều không phải là -F;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F, trong đó cả R_{4a} và R_{4b} có thể đều không phải là -F;

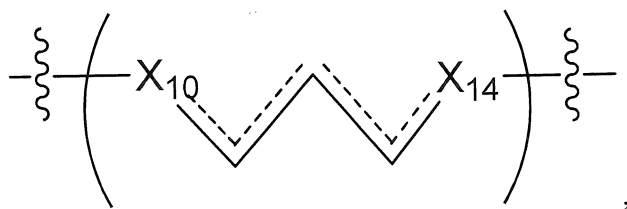
mỗi P₁ và P₂ độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ =O hoặc =S;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ -OR₅ và -SR₅;

trong đó R₅ được chọn từ nhóm bao gồm -H, C₁₋₆alkyl, và -C(O)C₁₋₆alkyl;

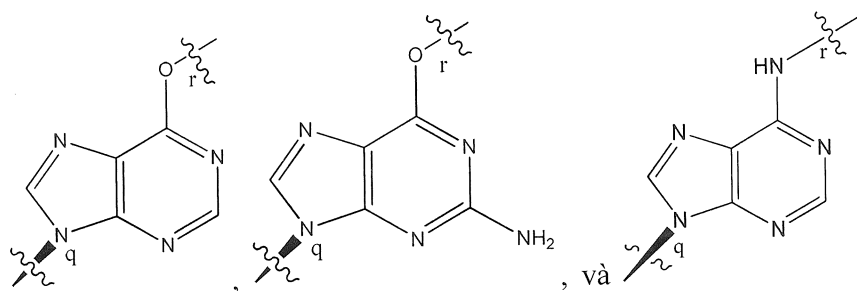
L₁ trong công thức (IV) có chiều dài bốn hoặc năm cacbon, và là



trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi, và trong đó 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L₁ chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là cis hoặc trans;

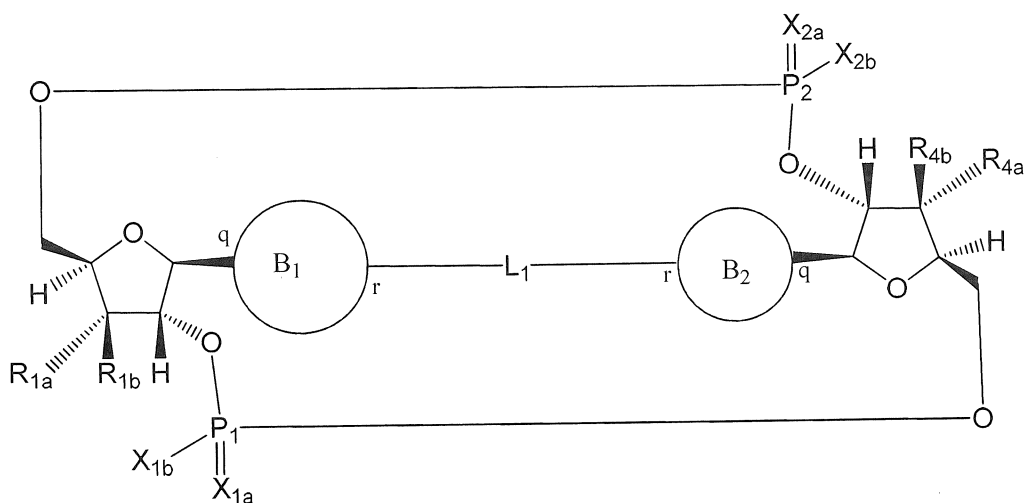
trong đó X₁₀ và X₁₄ độc lập được chọn từ liên kết, -CH-, hoặc -CH₂-, và trong đó, khi X₁₀ hoặc X₁₄ là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi;

trong đó B₁ và B₂ độc lập được chọn từ:



, trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B₁ và B₂ được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (IV).

4. Hợp chất có Công thức (V):



(V)

hoặc muối được dụng của chúng, trong đó

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH và -F, trong đó ít nhất một trong số R_{1a} và R_{1b} là -H;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, và -F, trong đó ít nhất một trong số R_{4a} và R_{4b} là -H;

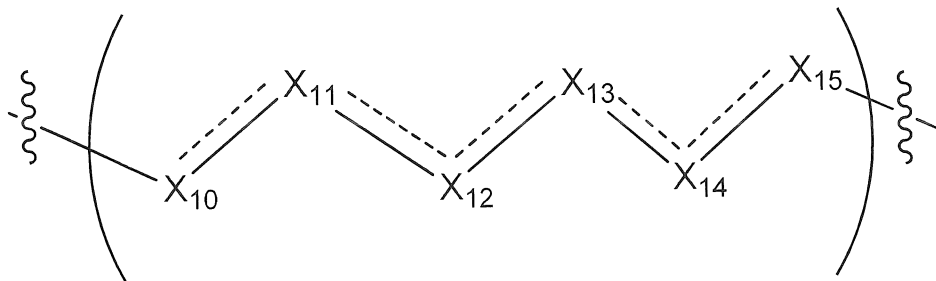
mỗi P₁ và P₂ độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ =O hoặc =S;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ -OR₅ và -SR₅;

trong đó R_5 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $C_{1-6}alkyl$, $-C(O)C_{1-6}alkyl$ và $-CH_2OC(O)OC_{1-6}alkyl$;

L_1 trong công thức (V) có chiều dài bốn, năm hoặc sáu cacbon, và là

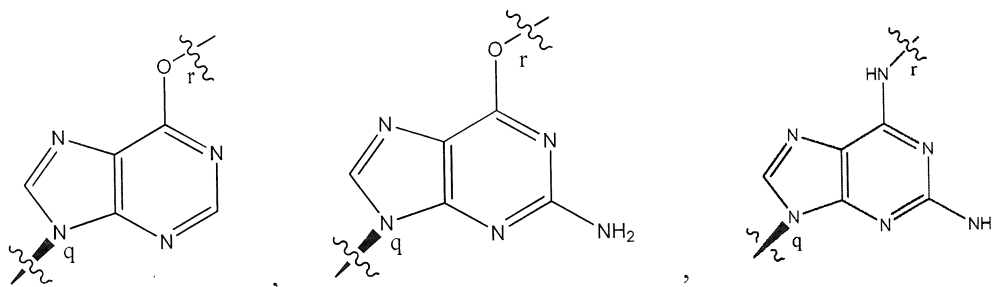


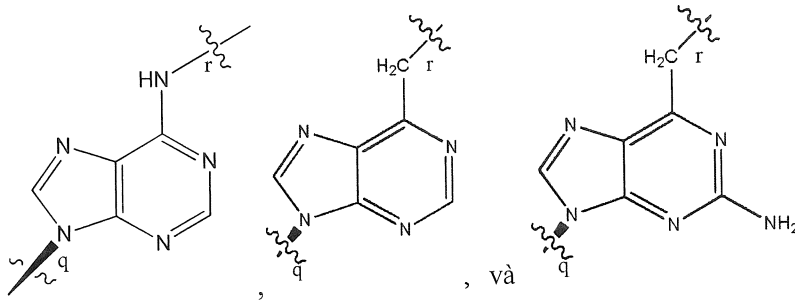
trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba và trong đó (i) 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba; hoặc (ii) 0, 1, hoặc 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về từng liên kết đôi là cis hoặc trans; và (iii) trong đó khi 1 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết ba, 0 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi; và (iv) trong đó, khi 2 sự xuất hiện của ----- trong L_1 chỉ ra liên kết đôi, các liên kết đôi này là các liên kết liên kề hoặc các liên kết xen kẽ;

trong đó X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} độc lập được chọn từ liên kết, $-CH_2-$, hoặc $-CH-$, trong đó $-CH_2-$ hoặc $-CH-$ không được thế hoặc được thế bởi (i) $-OH$, (ii) $-F$, (iii) $-Cl$, (iv) $-NH_2$, hoặc (v) $-D$, và khi X_{10} hoặc X_{15} là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi hoặc liên kết ba;

và trong đó hai thành viên liên kề bất kỳ của nhóm bao gồm X_{10} , X_{11} , X_{12} , X_{13} , X_{14} , và X_{15} có thể tùy ý tạo thành, với các nguyên tử bổ sung, C_3 xycloalkyl hoặc C_3 heteroxycloalkyl, C_3 heteroxycloalkyl này bao gồm nguyên tử N hoặc O;

trong đó B_1 và B_2 độc lập được chọn từ:





trong đó các liên kết tại các điểm q và r trên B₁ và B₂ được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (V),

hoặc trong đó

R_{1a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{1b} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F, trong đó cả R_{1a} và R_{1b} có thể đều không phải là -F;

R_{4a} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F;

R_{4b} được chọn từ nhóm bao gồm -H và -F, trong đó cả R_{4a} và R_{4b} có thể đều không phải là -F;

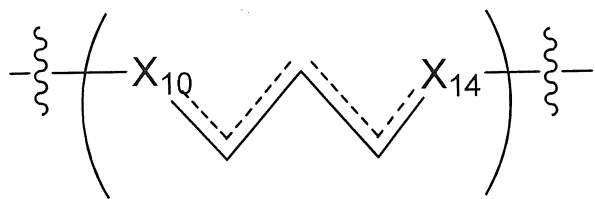
mỗi P₁ và P₂ độc lập có cấu hình hóa học lập thể S hoặc R;

X_{1a} và X_{2a} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ =O hoặc =S;

X_{1b} và X_{2b} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ -OR₅ và -SR₅;

trong đó R₅ được chọn từ nhóm bao gồm -H, C₁₋₆alkyl, và -C(O)C₁₋₆alkyl;

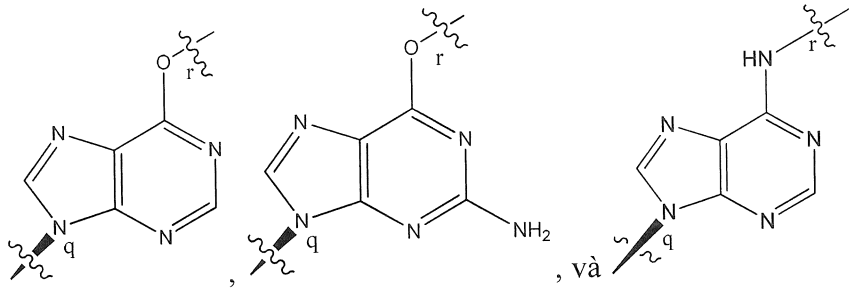
L₁ trong công thức (V) có chiều dài bốn hoặc năm cacbon, và là



trong đó ----- chỉ ra liên kết đơn hoặc liên kết đôi, và trong đó 0 hoặc 1 sự xuất hiện của ----- trong L₁ chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là cis hoặc trans;

trong đó X₁₀ và X₁₄ độc lập được chọn từ liên kết, -CH-, hoặc -CH₂-, và trong đó, khi X₁₀ hoặc X₁₄ là liên kết, liên kết này không phải là liên kết đôi;

trong đó B₁ và B₂ độc lập được chọn từ:



kết tại các điểm q và r trên B₁ và B₂ được gắn tại các điểm q và r trên Công thức (V).

5. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó:

(i) cấu hình hóa học lập thể của P₁ và P₂ đều là R, cấu hình hóa học lập thể của P₁ là R và P₂ là S, hoặc cấu hình hóa học lập thể của P₁ là S và P₂ là R;

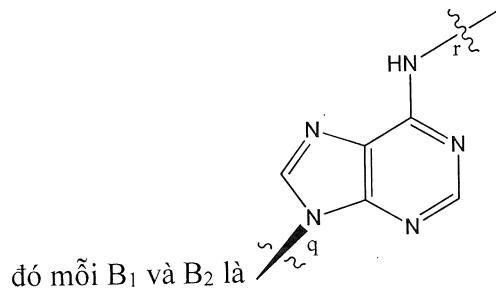
(ii) một sự xuất hiện của ----- trong L₁ chỉ ra liên kết đôi, trong đó hình học về liên kết đôi này là trans; và

(iii) Z là --O-- .

6. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm 5, trong đó mỗi R_{1a} và R_{4a} là --F .

7. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm 5, trong đó mỗi R_{1b} và R_{4b} là --F .

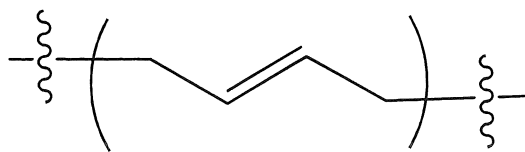
8. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong



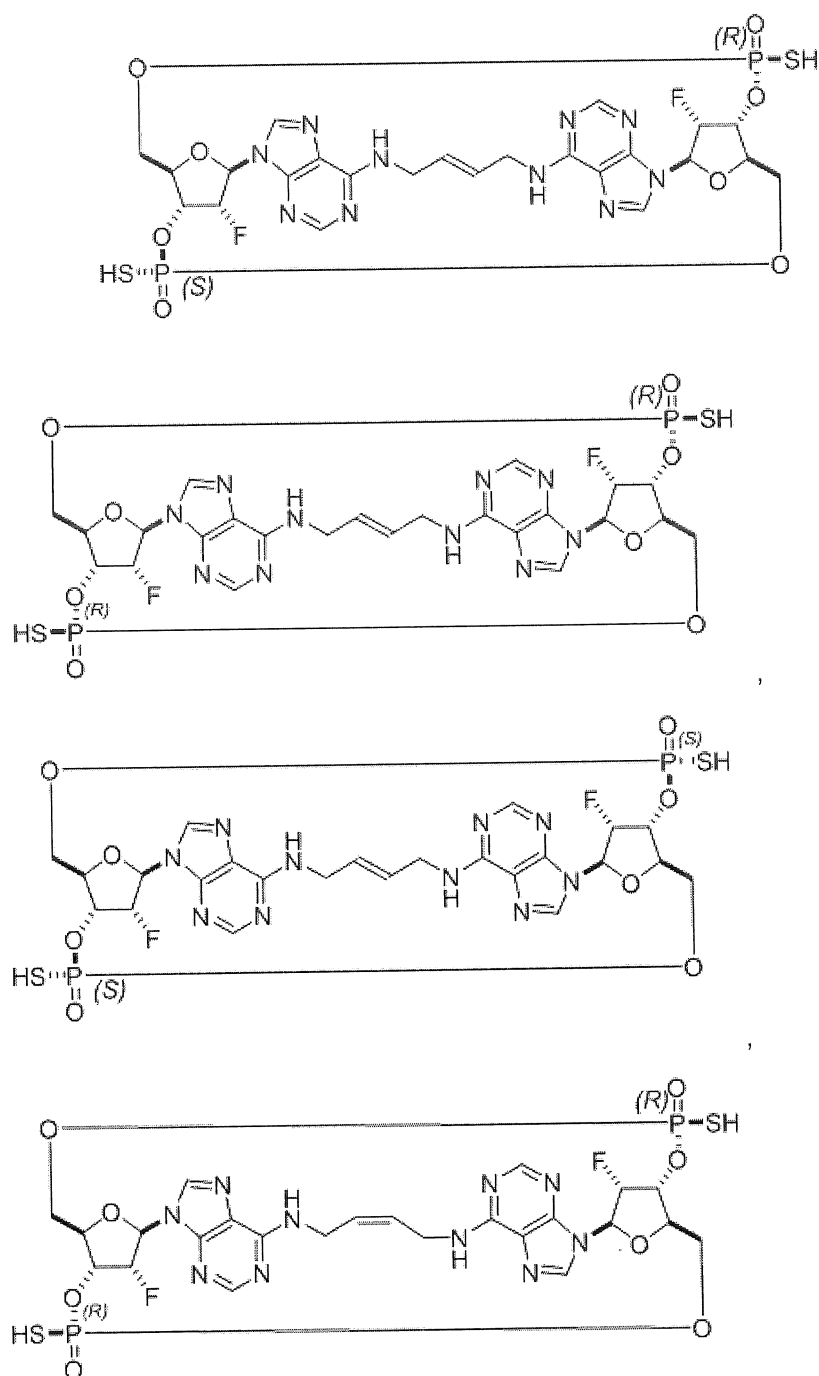
đó mỗi B₁ và B₂ là

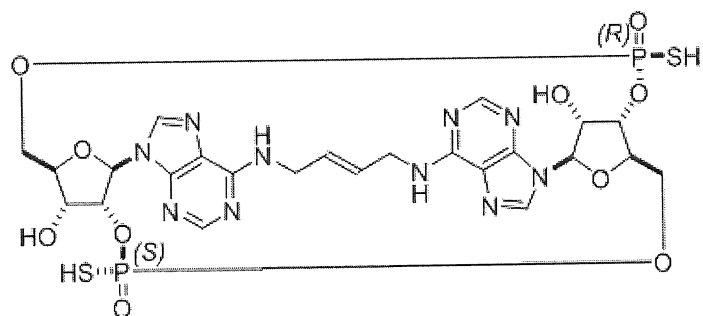
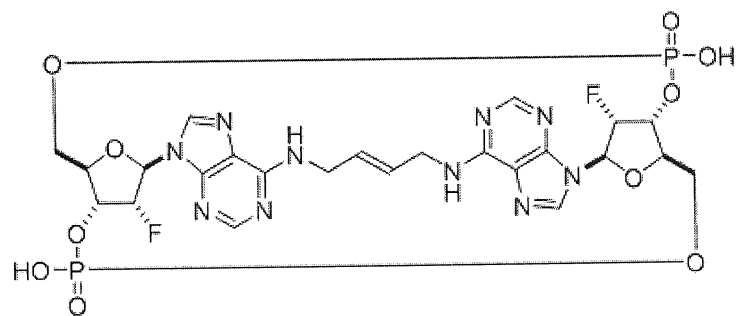
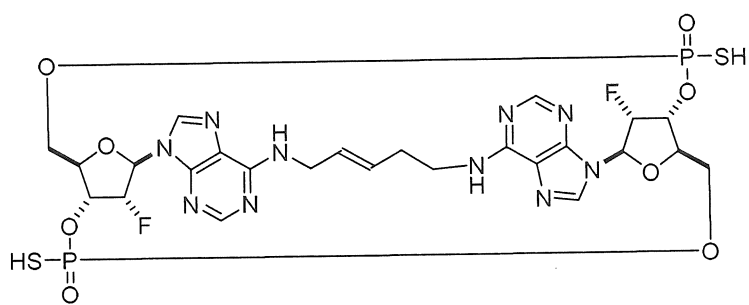
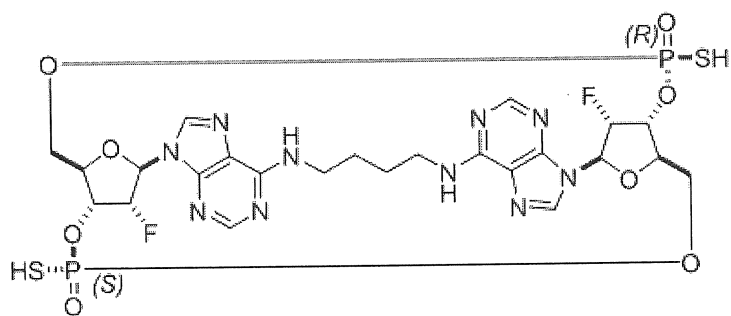
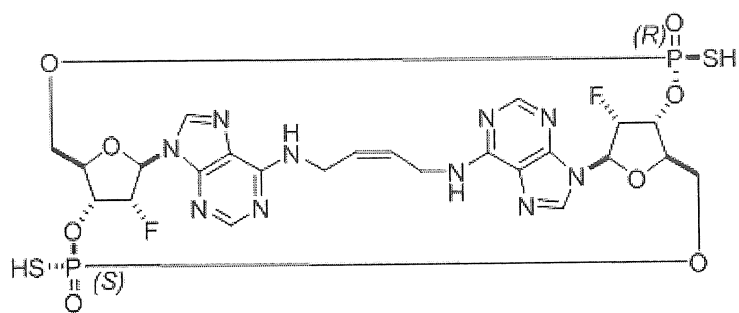
9. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm 8, trong đó cả X_{1a} và X_{2a} đều là =O , và cả X_{1b} và X_{2b} đều là --SH .

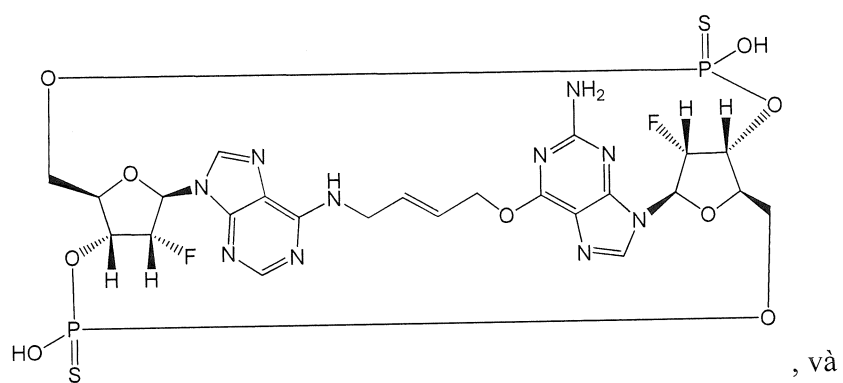
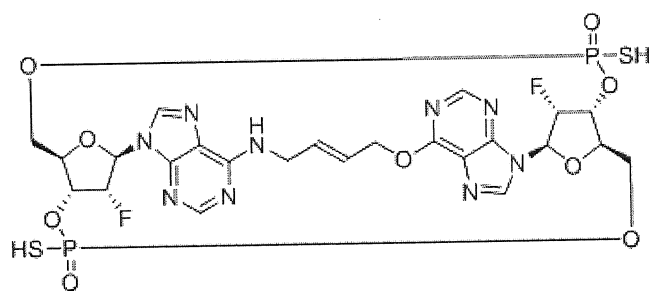
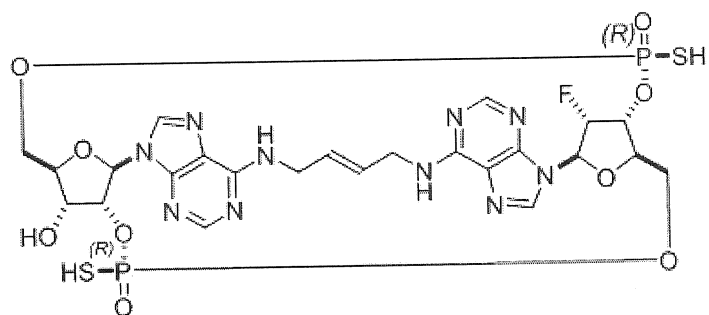
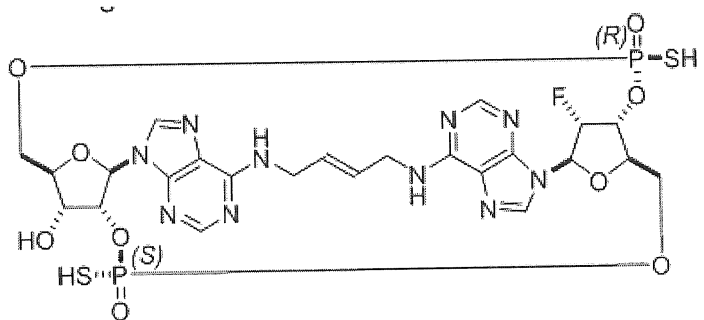
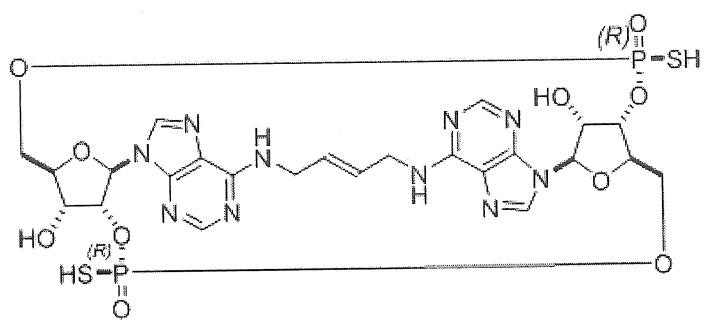
10. Hợp chất hoặc muối được dựng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó L₁ có chiều dài bốn hoặc năm cacbon hoặc trong đó L₁ là

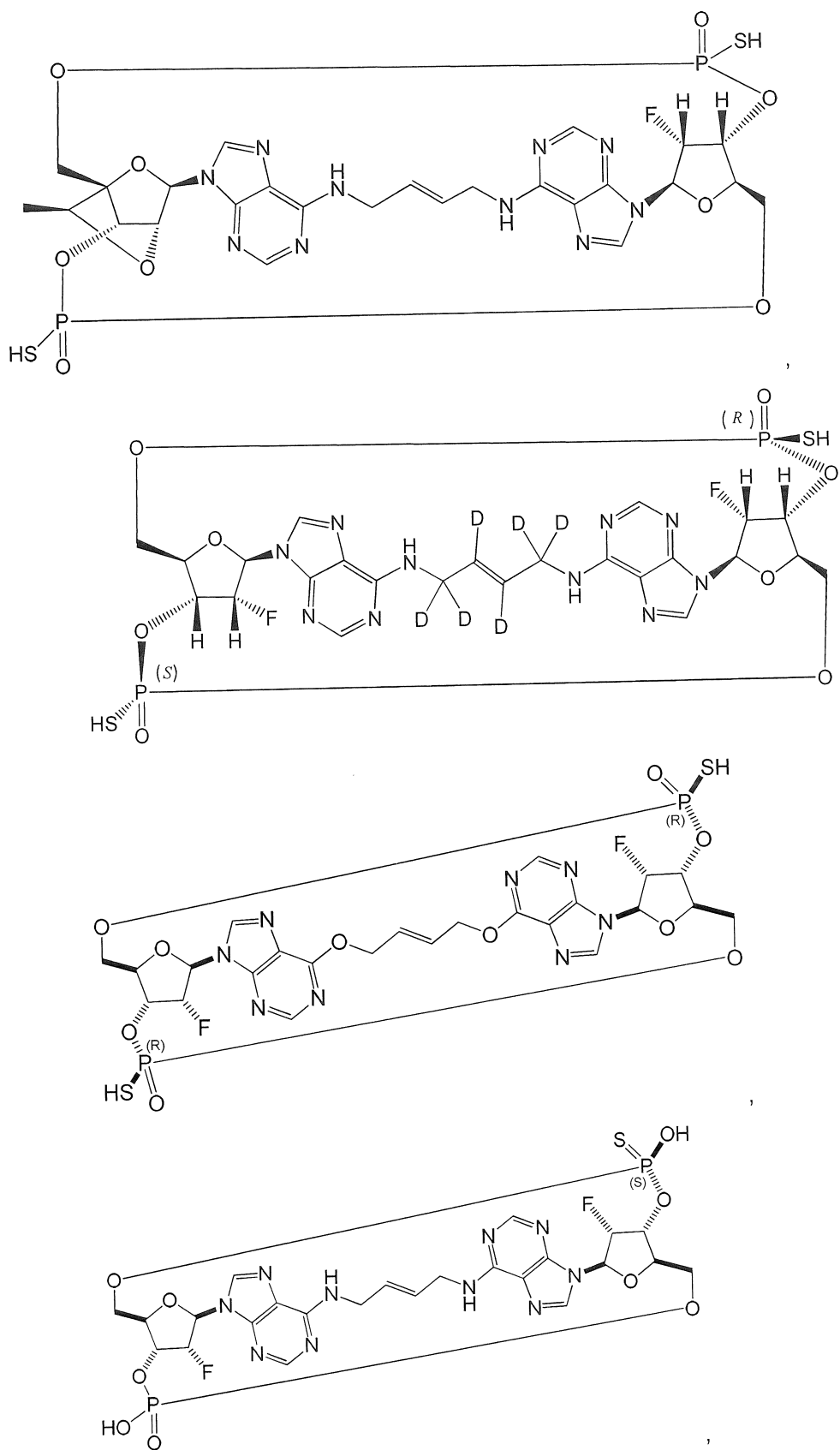


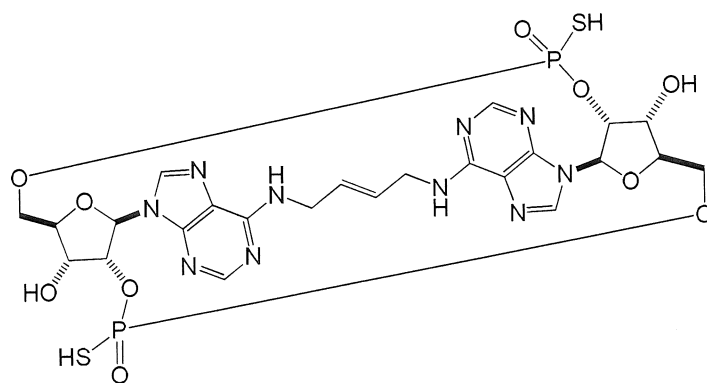
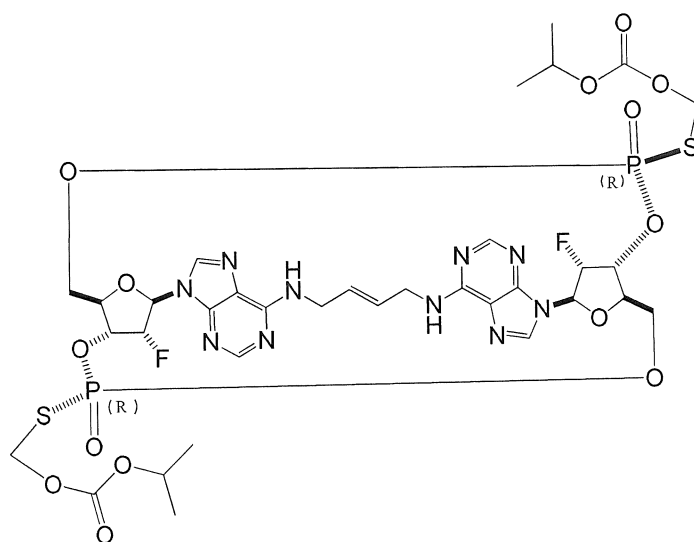
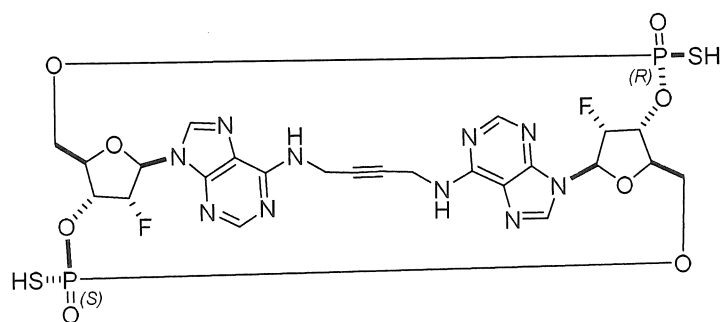
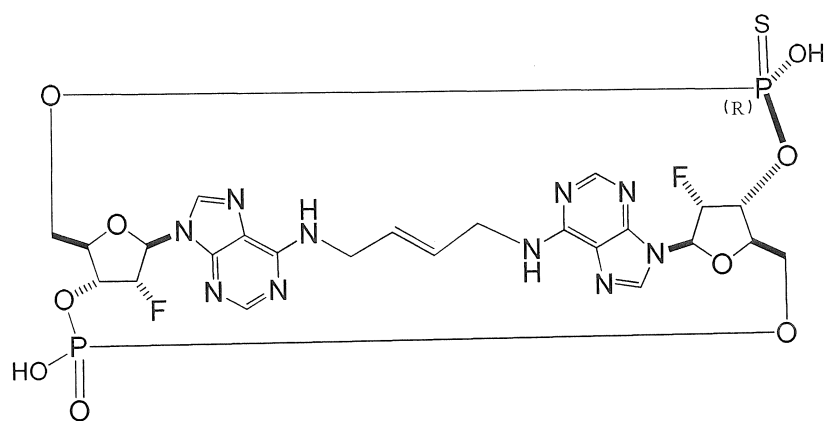
11. Hợp chất hoặc muối được dụng của chúng, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:

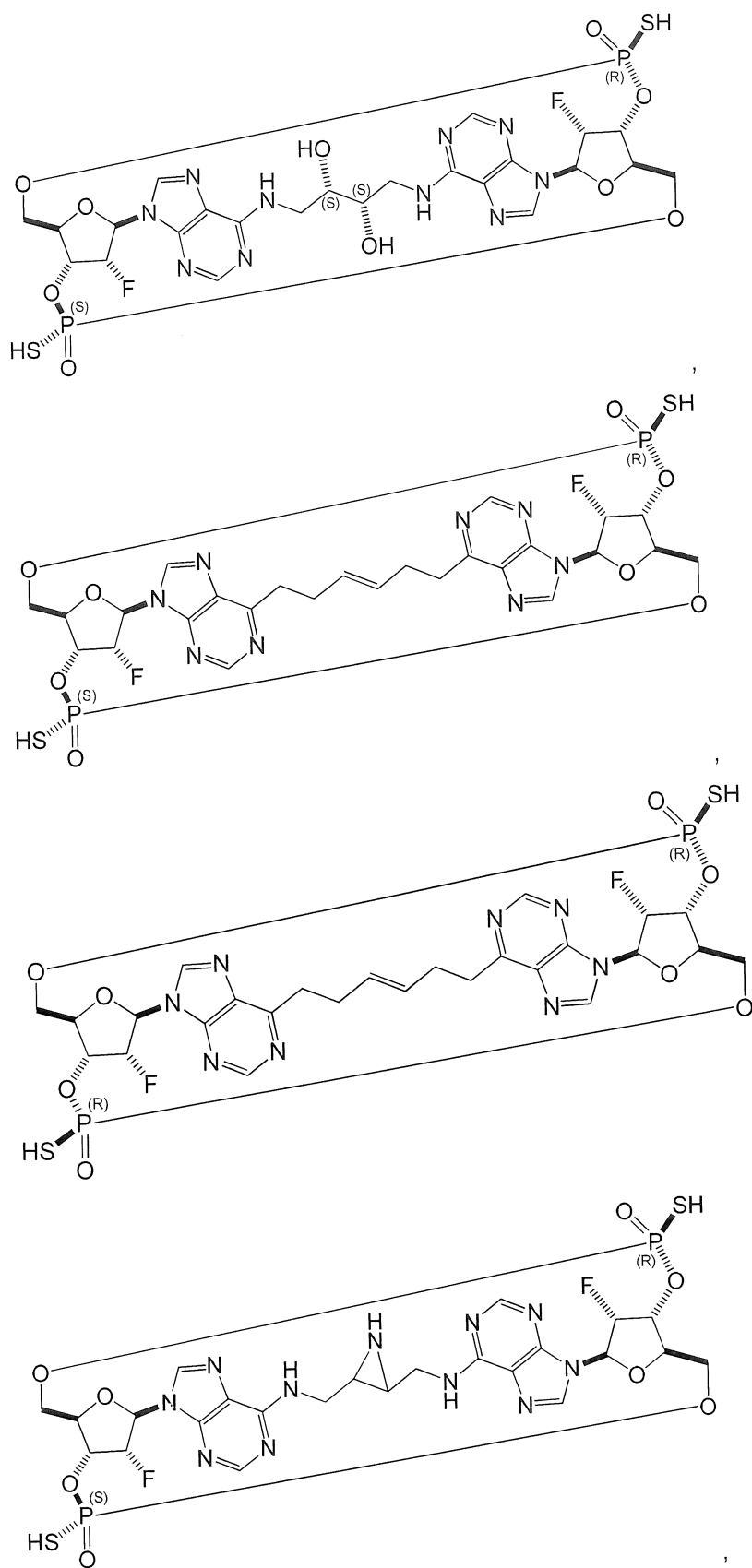


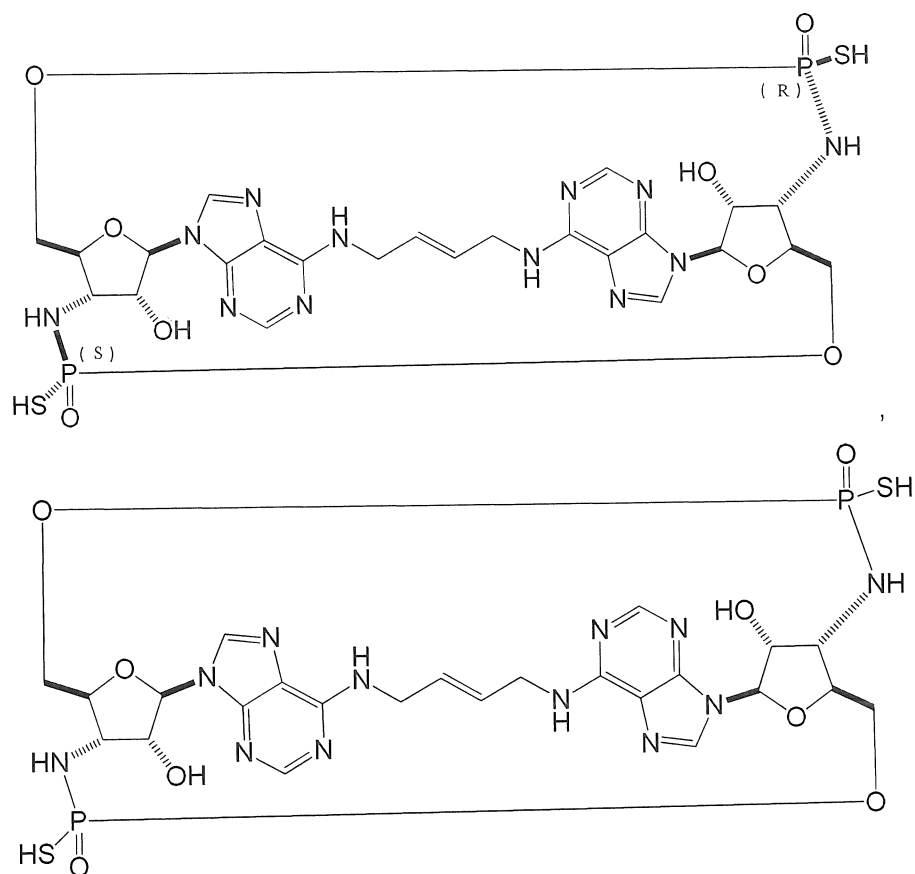






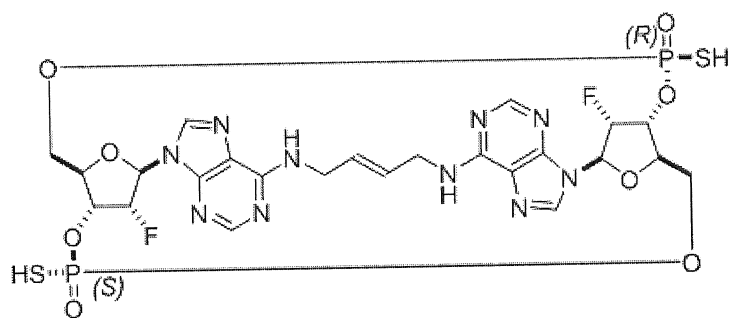


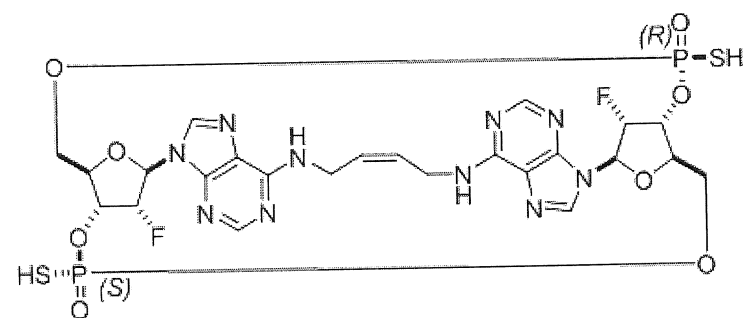
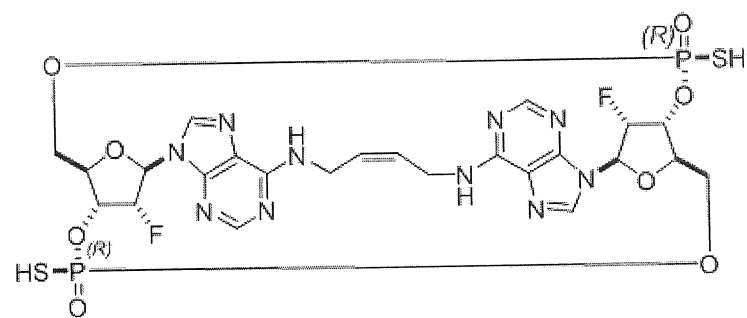
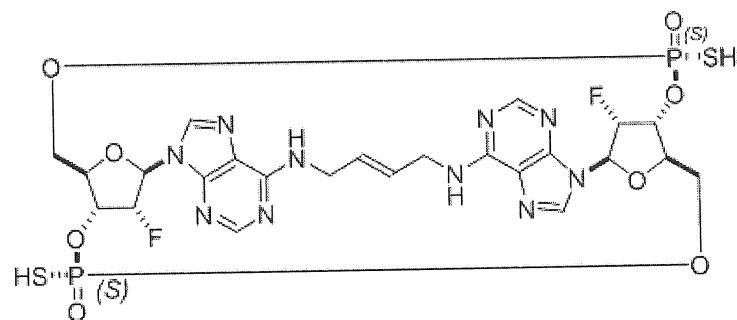
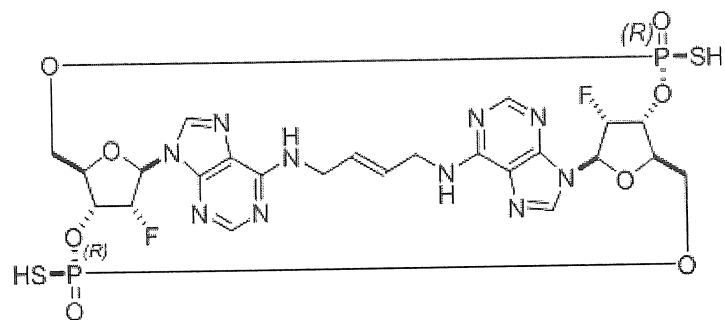


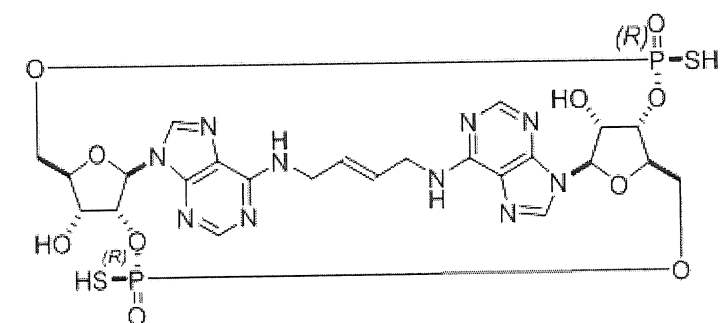
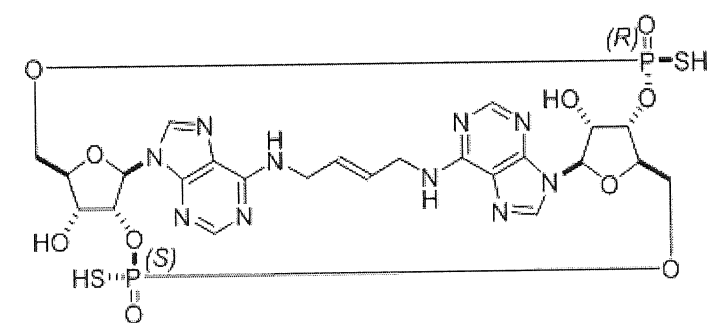
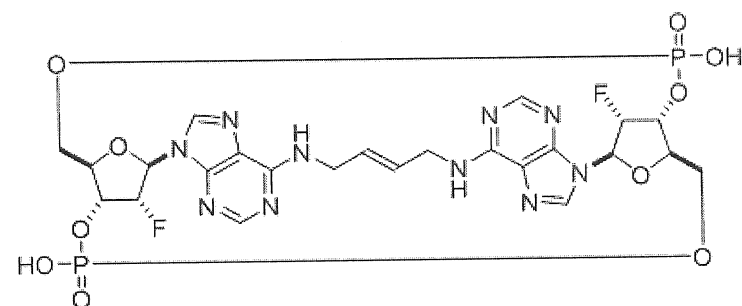
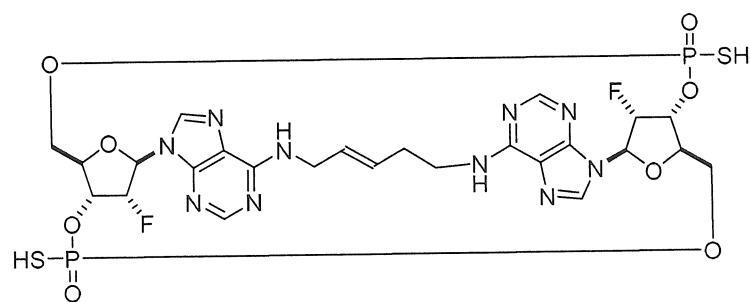
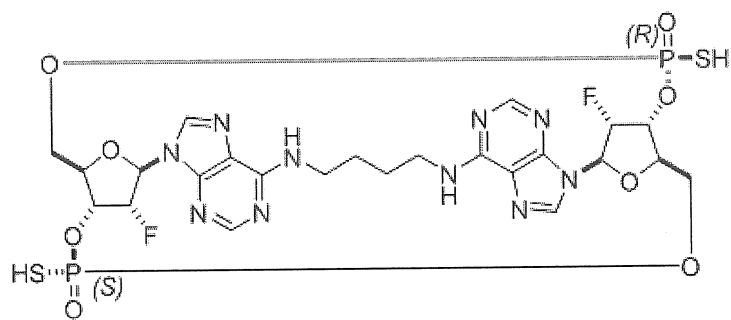


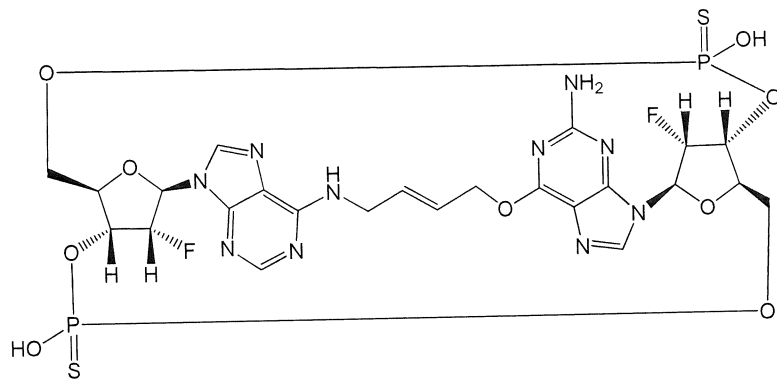
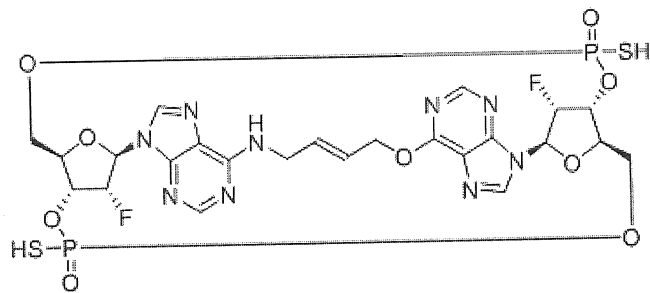
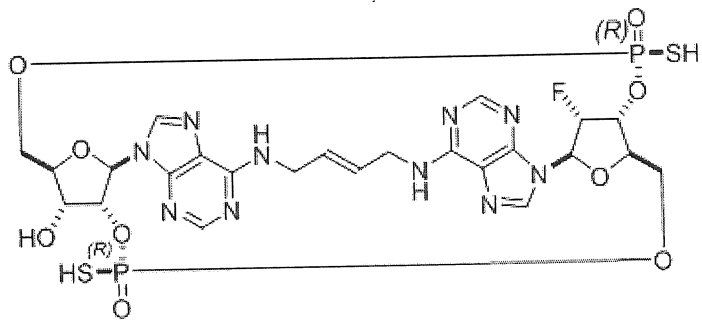
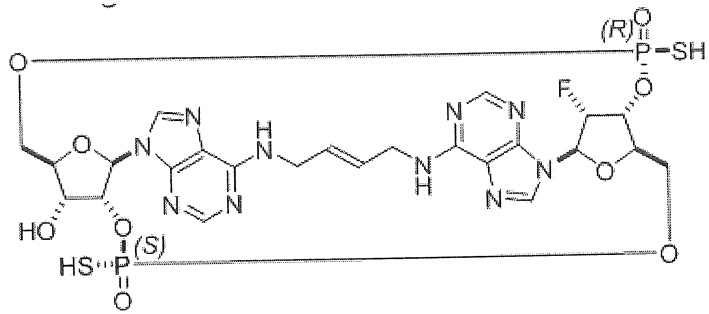
hoặc muối được dụng của chúng.

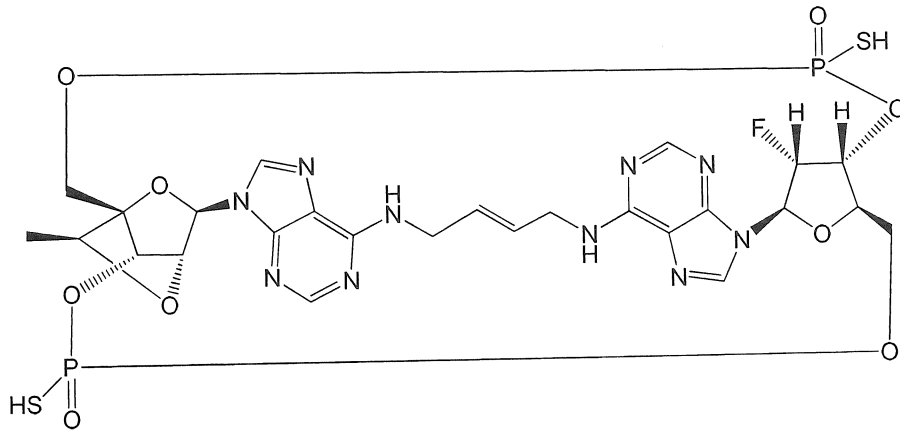
12. Hợp chất hoặc muối được dụng của chúng theo điểm 11, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:







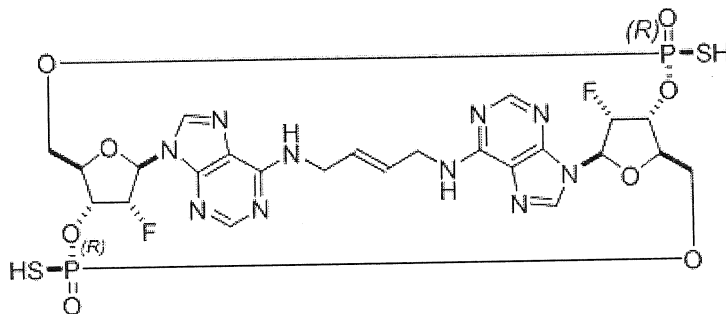




hoặc muối được dụng của chúng.

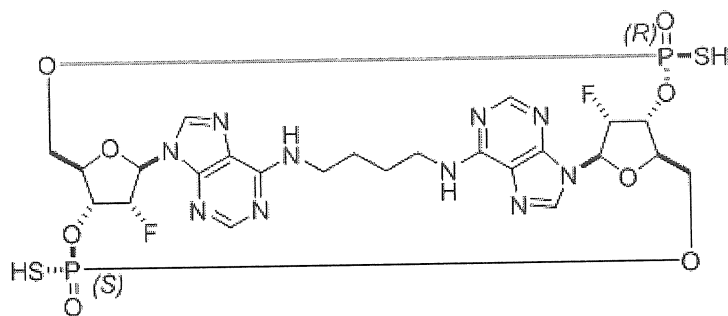
13. Hợp chất hoặc muối được dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó hợp chất hoặc muối được dụng này có (i) giá trị EC_{50} thấp hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING HAQ người; (ii) giá trị EC_{50} thấp hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING AQ người; (iii) giá trị EC_{50} thấp hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING WT người; hoặc (iv) giá trị EC_{50} thấp hơn 100 micromol trong các tế bào báo cáo biểu hiện biến thể STING REF người.

14. Hợp chất hoặc muối được dụng theo điểm 12, trong đó hợp chất này là:



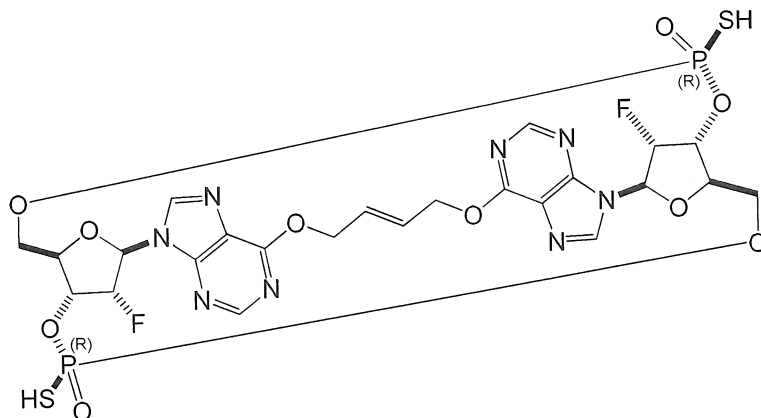
hoặc muối được dụng của nó.

15. Hợp chất hoặc muối được dụng theo điểm 12, trong đó hợp chất này là:



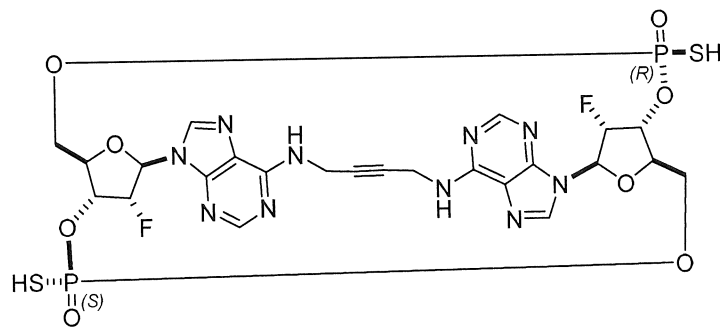
hoặc muối được dụng của nó.

16. Hợp chất hoặc muối được dụng theo điểm 12, trong đó hợp chất này là:



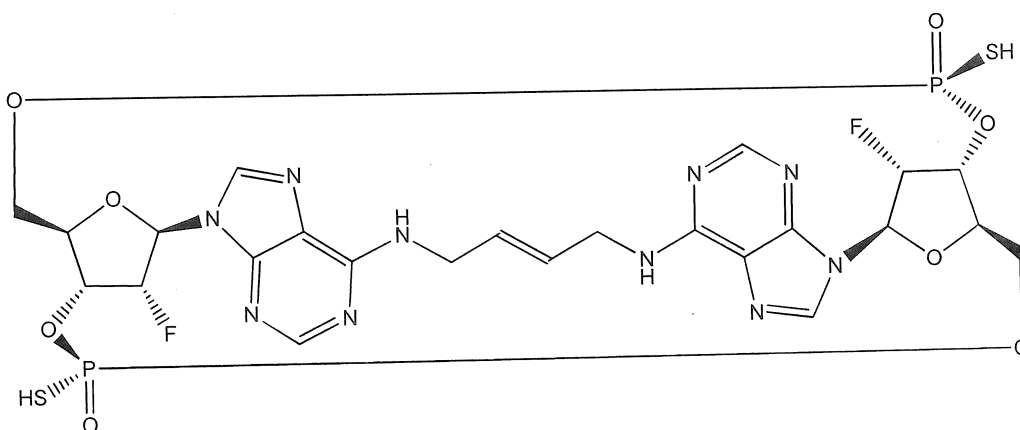
hoặc muối được dụng của nó.

17. Hợp chất hoặc muối được dụng theo điểm 12, trong đó hợp chất này là:



hoặc muối được dụng của nó.

18. Hợp chất hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



19. Muối được dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó muối này là muối diamoni.

20. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 18 hoặc muối được dụng của chúng, và tá dược được dụng.

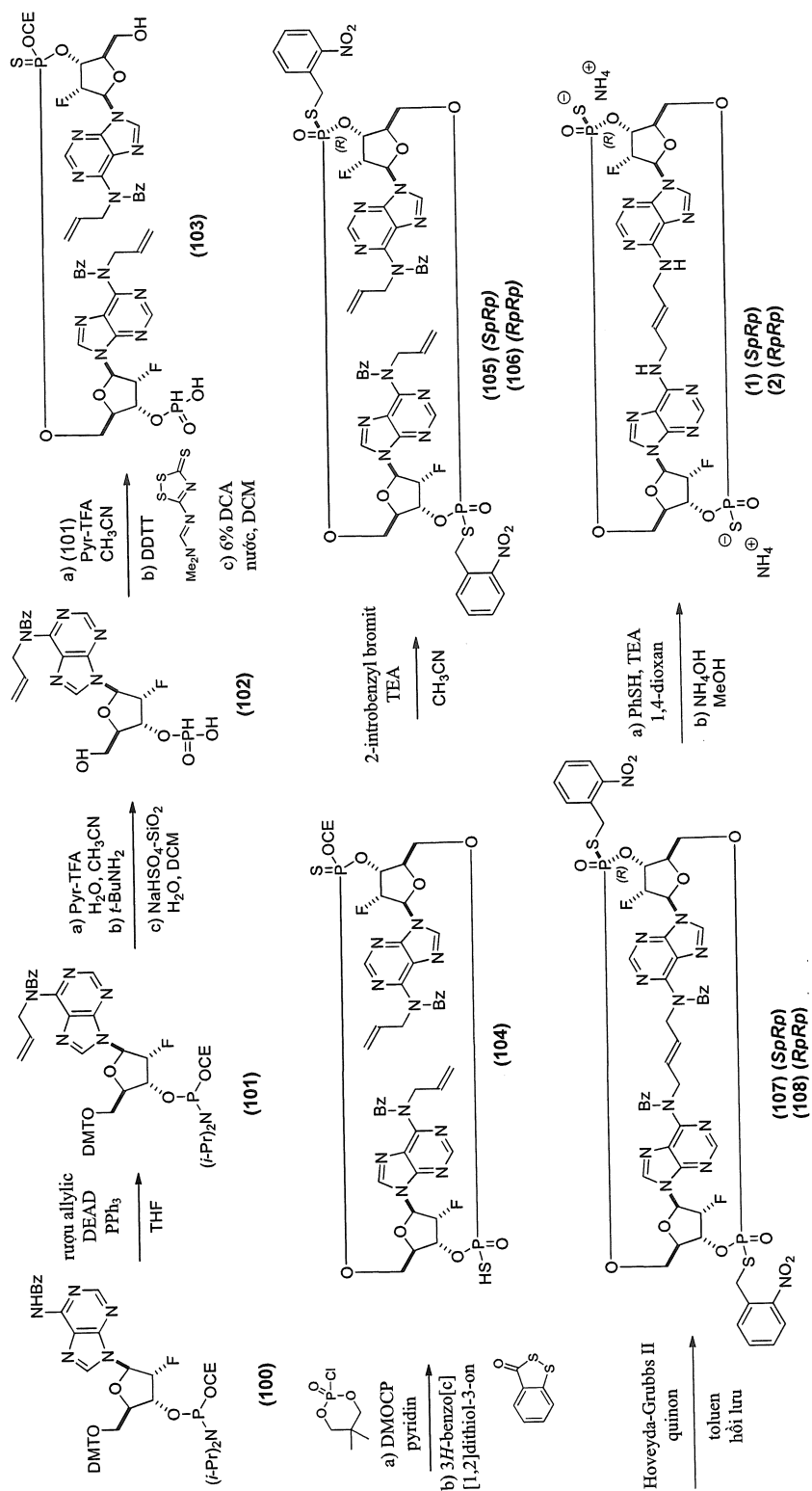


FIG. 2A

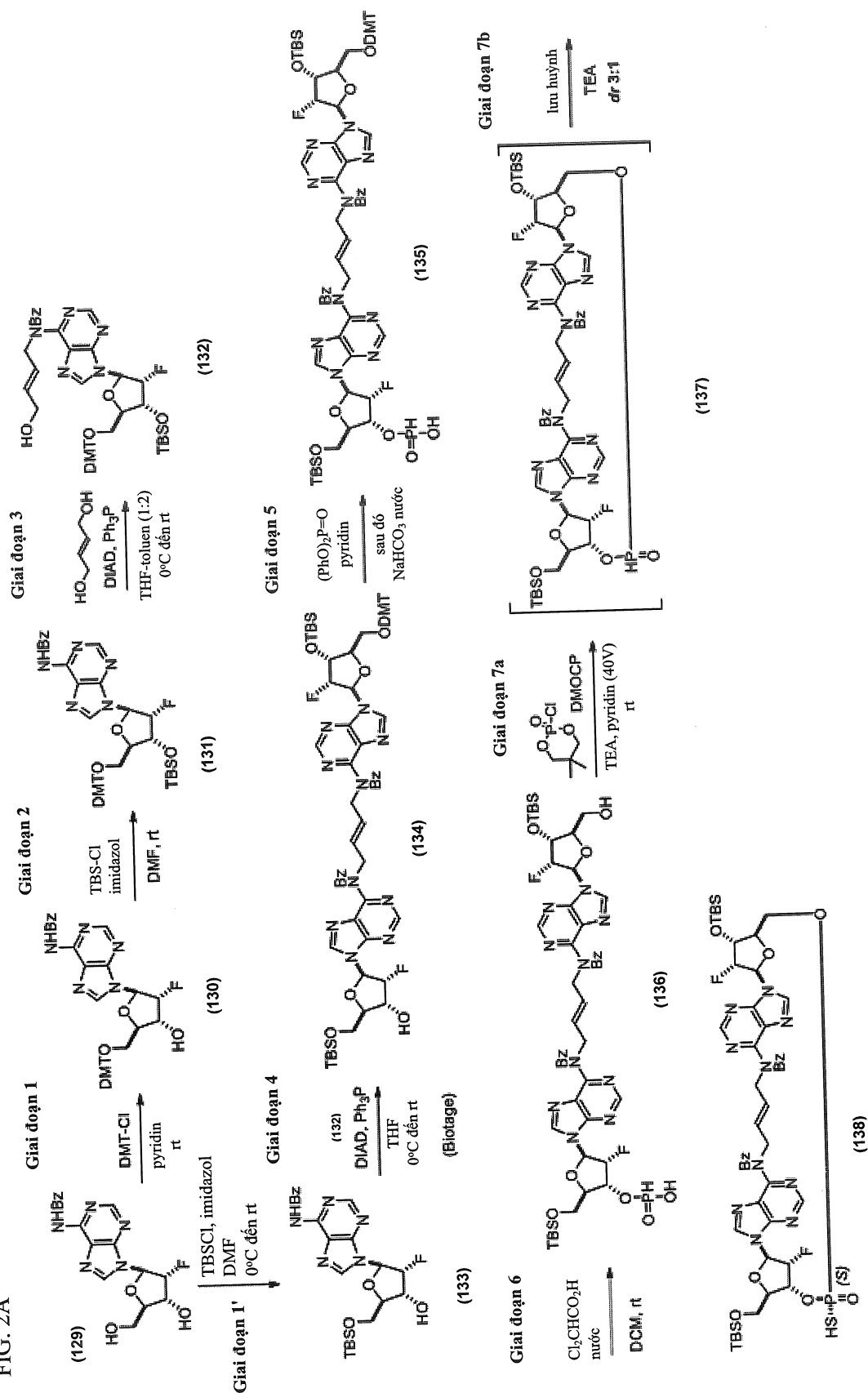


FIG. 2B

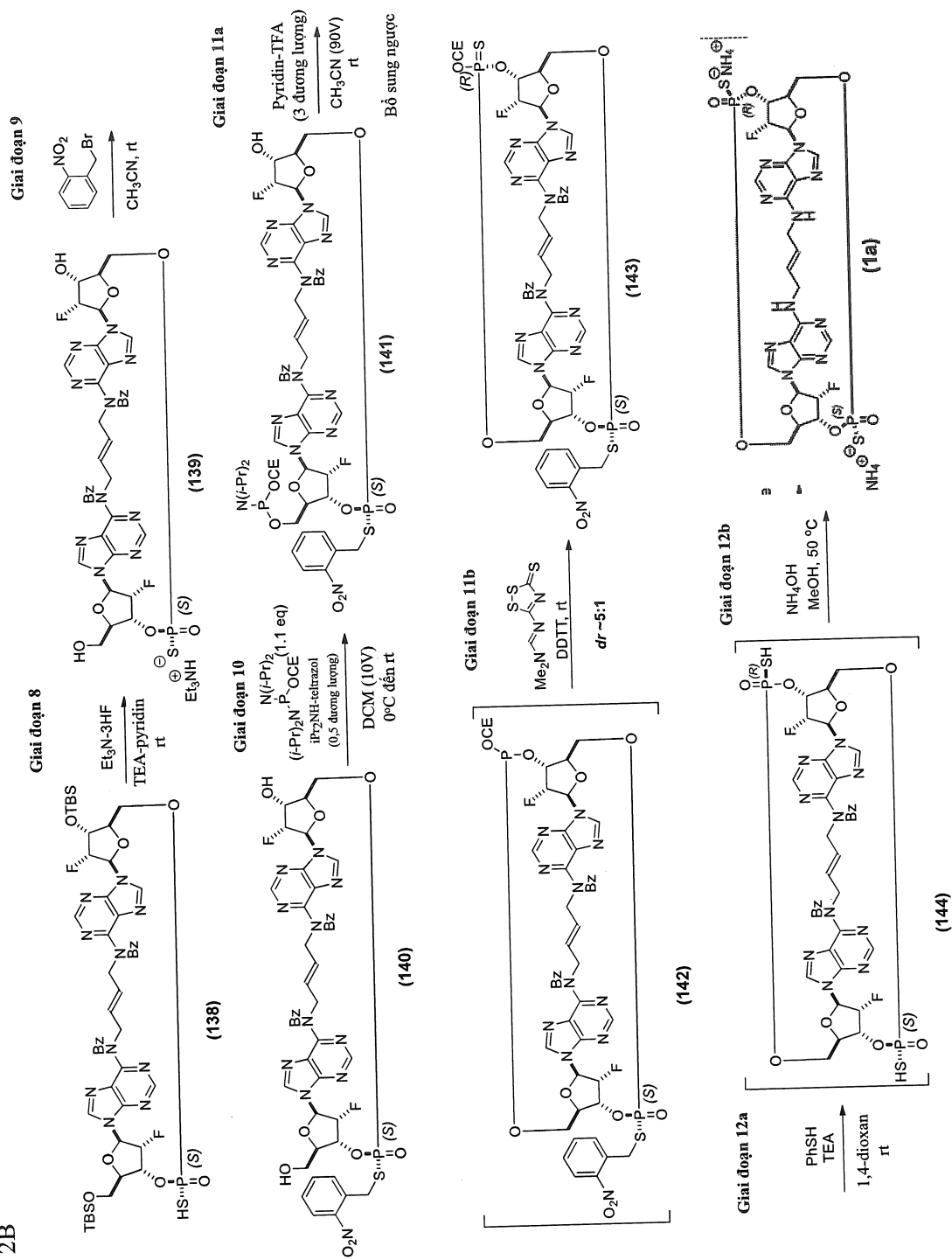


FIG. 2C

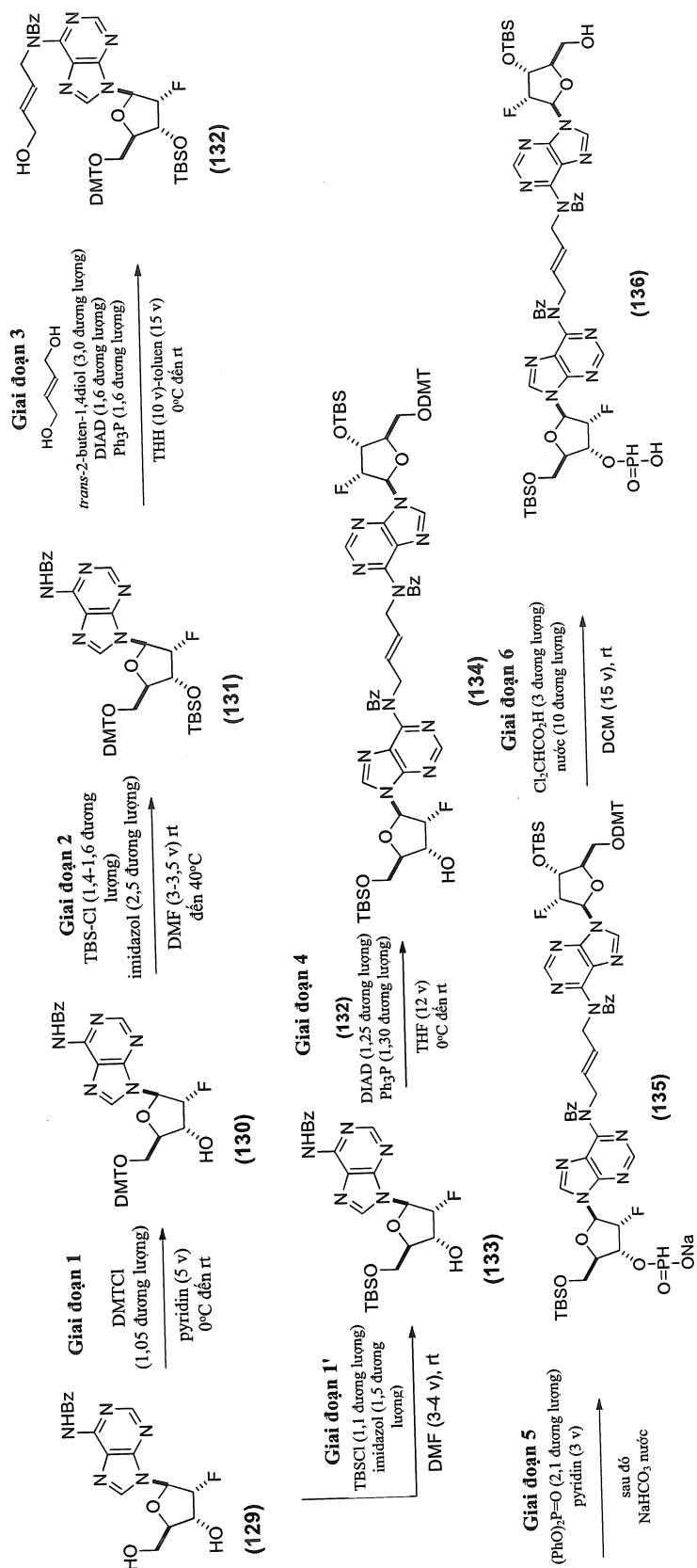


FIG. 2D

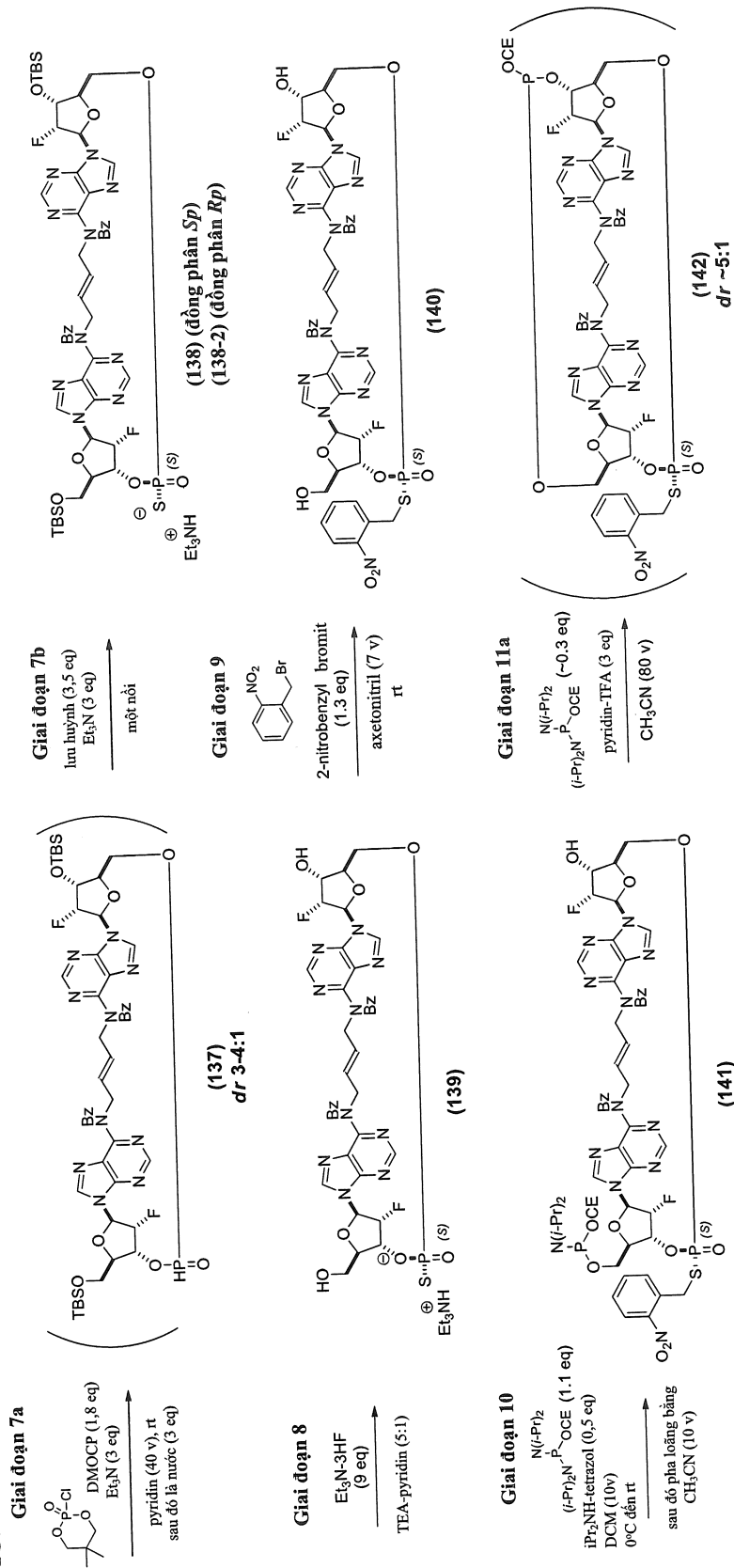


FIG. 2E

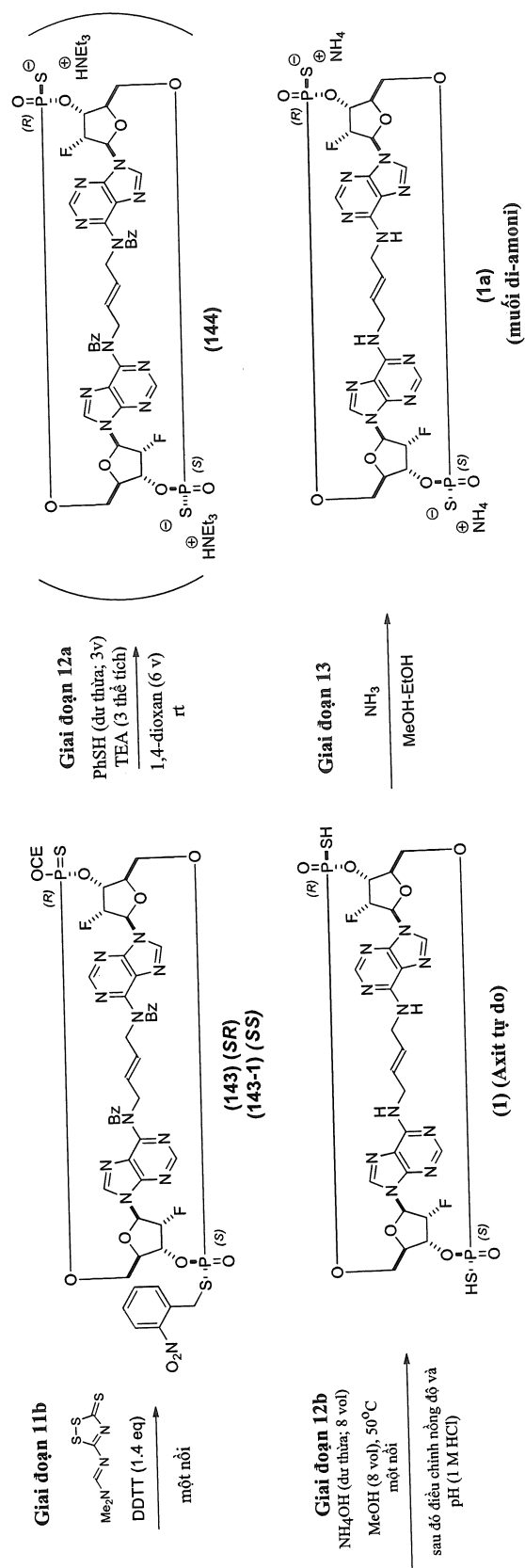
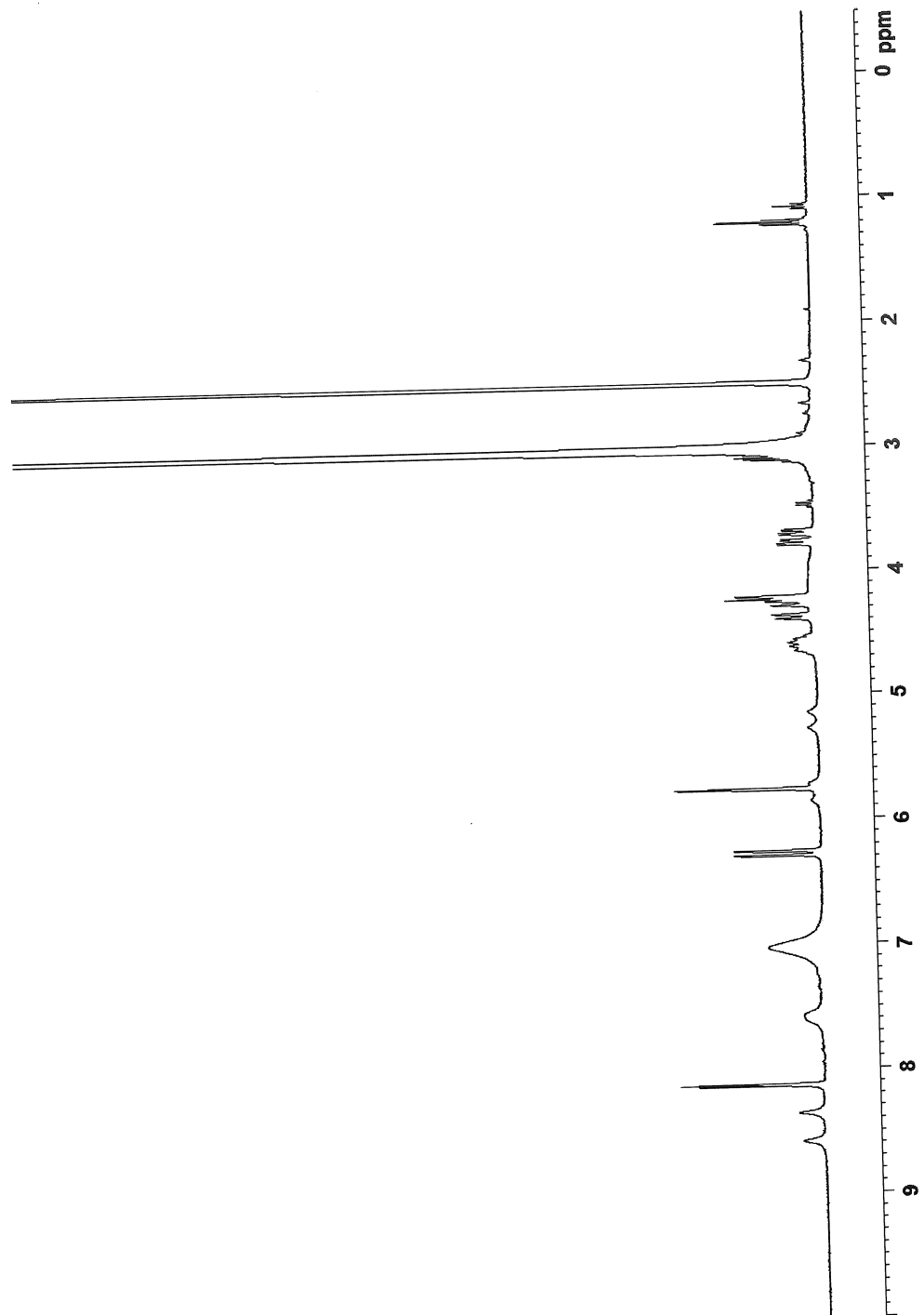


FIG. 3



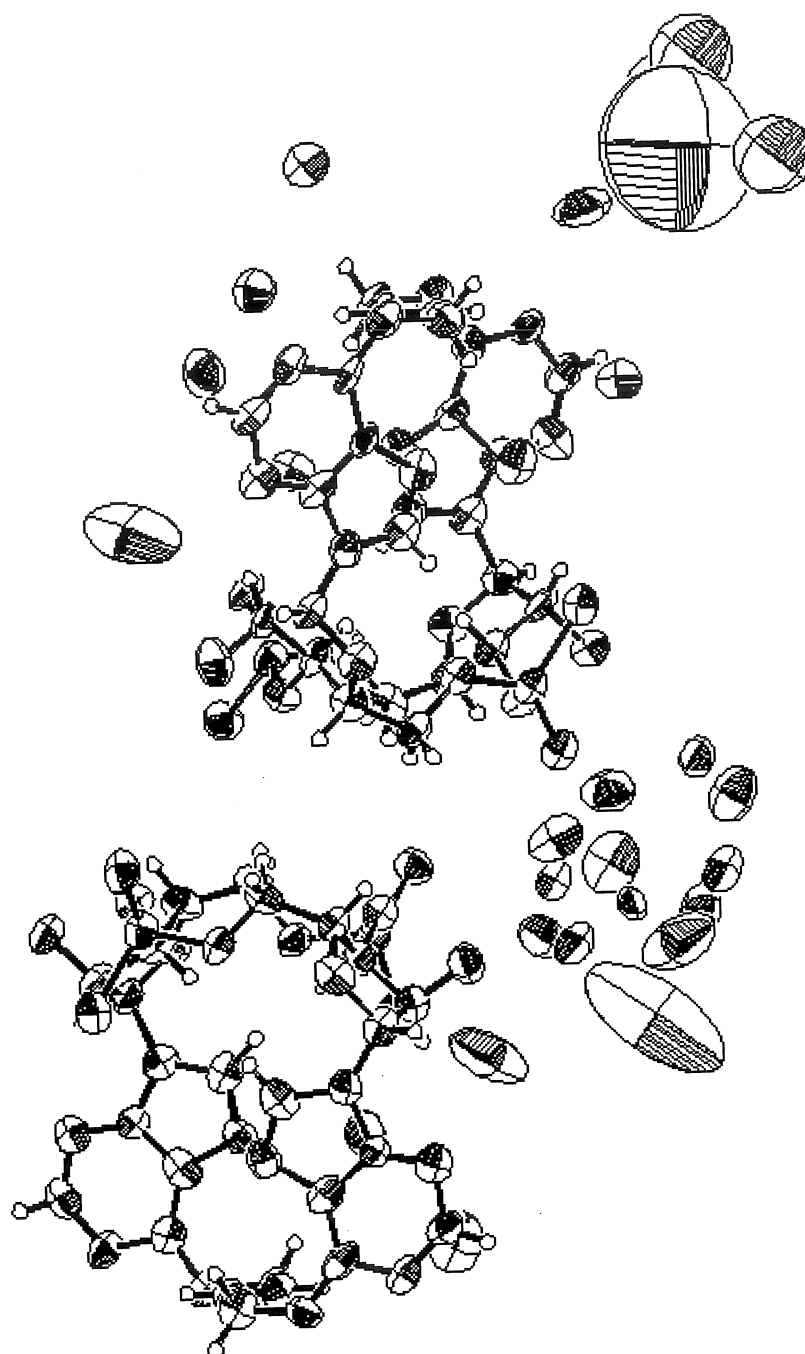


FIG. 4A

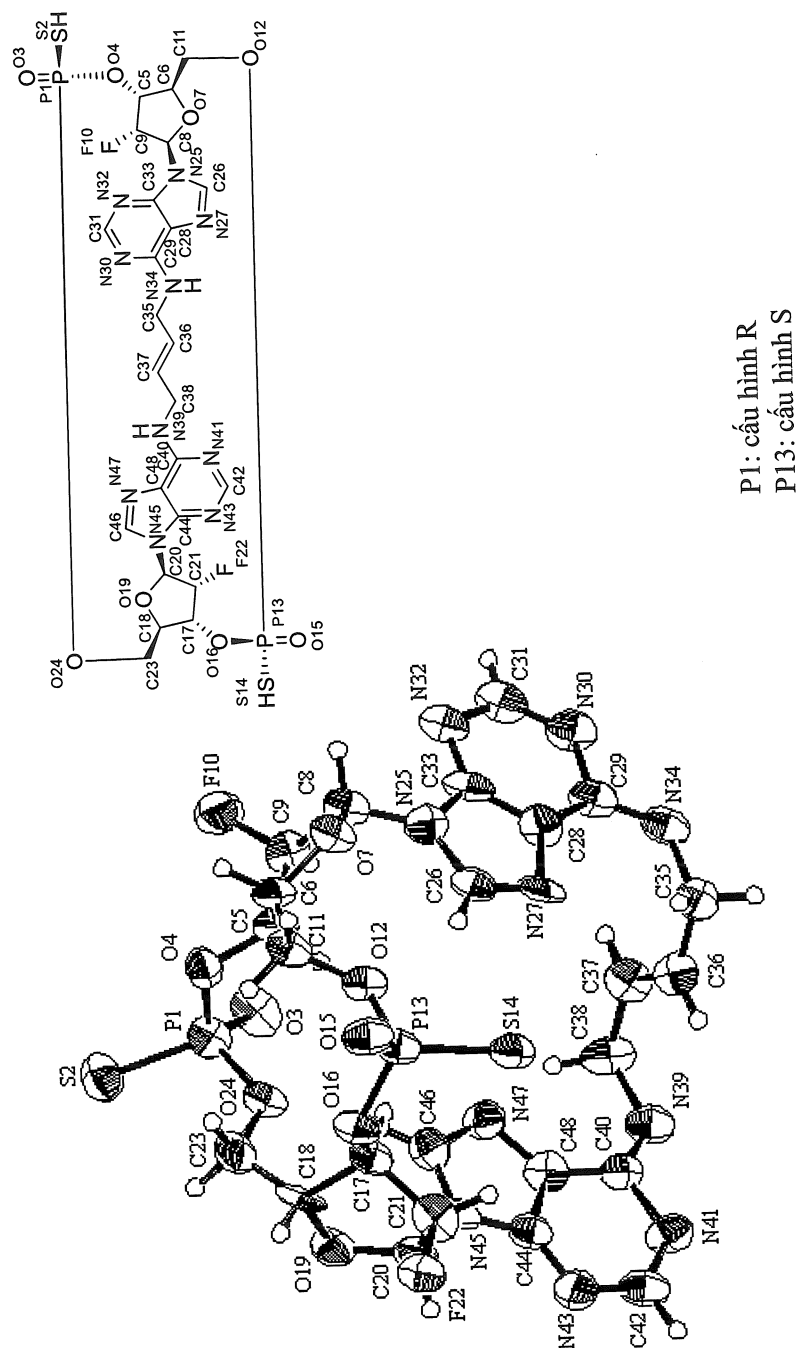


FIG. 4C

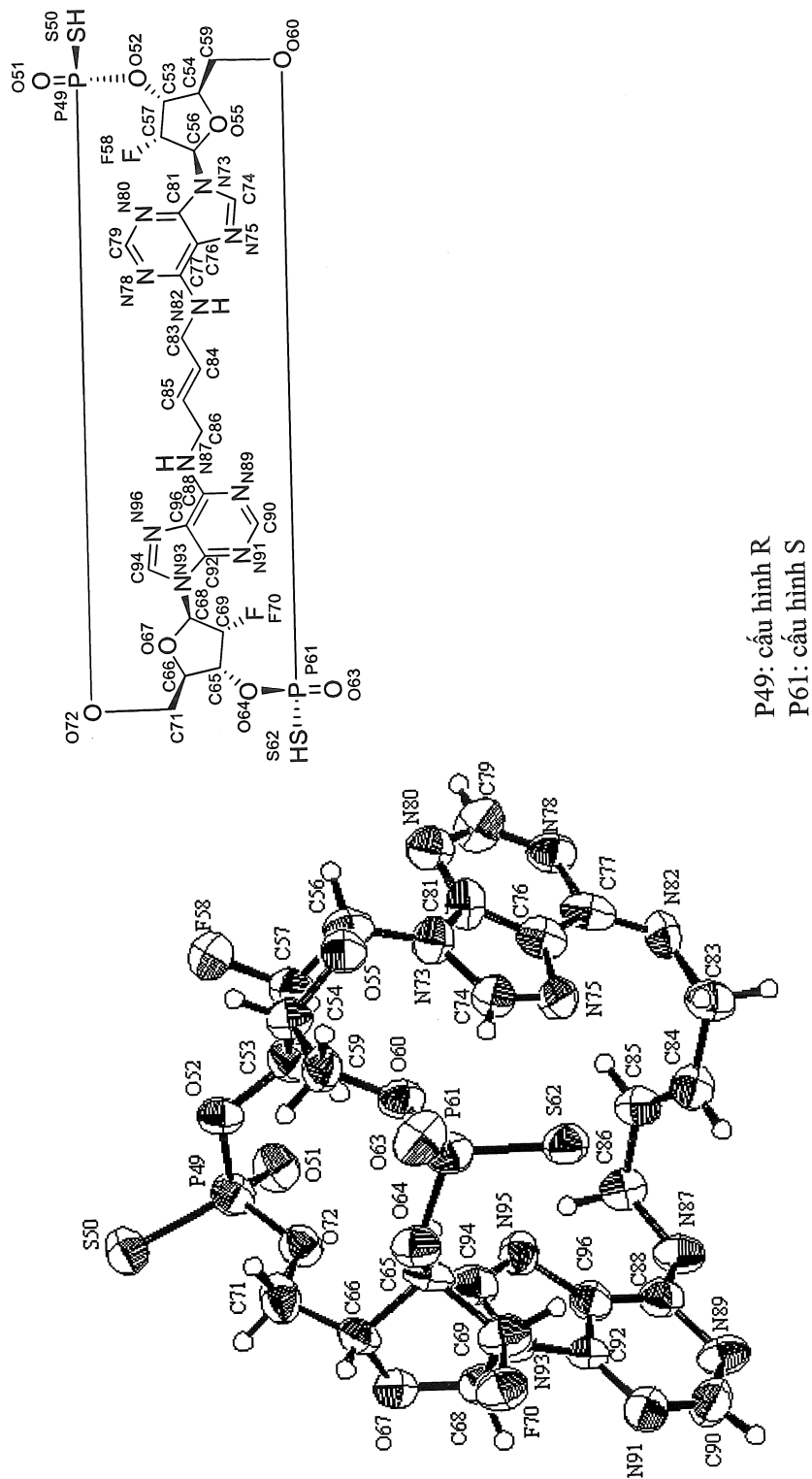
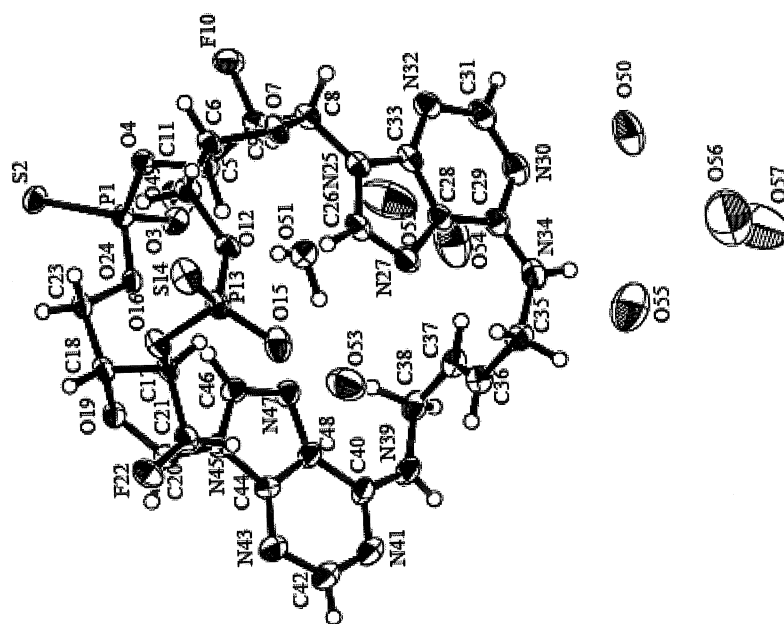
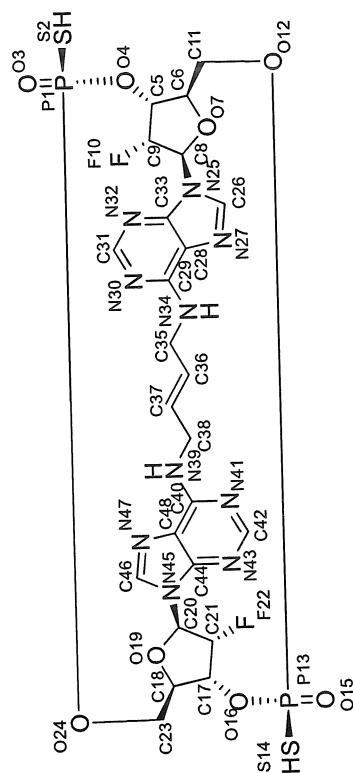


FIG. 4D



P1: cấu hình R
P13: cấu hình S



12/21

FIG. 5A

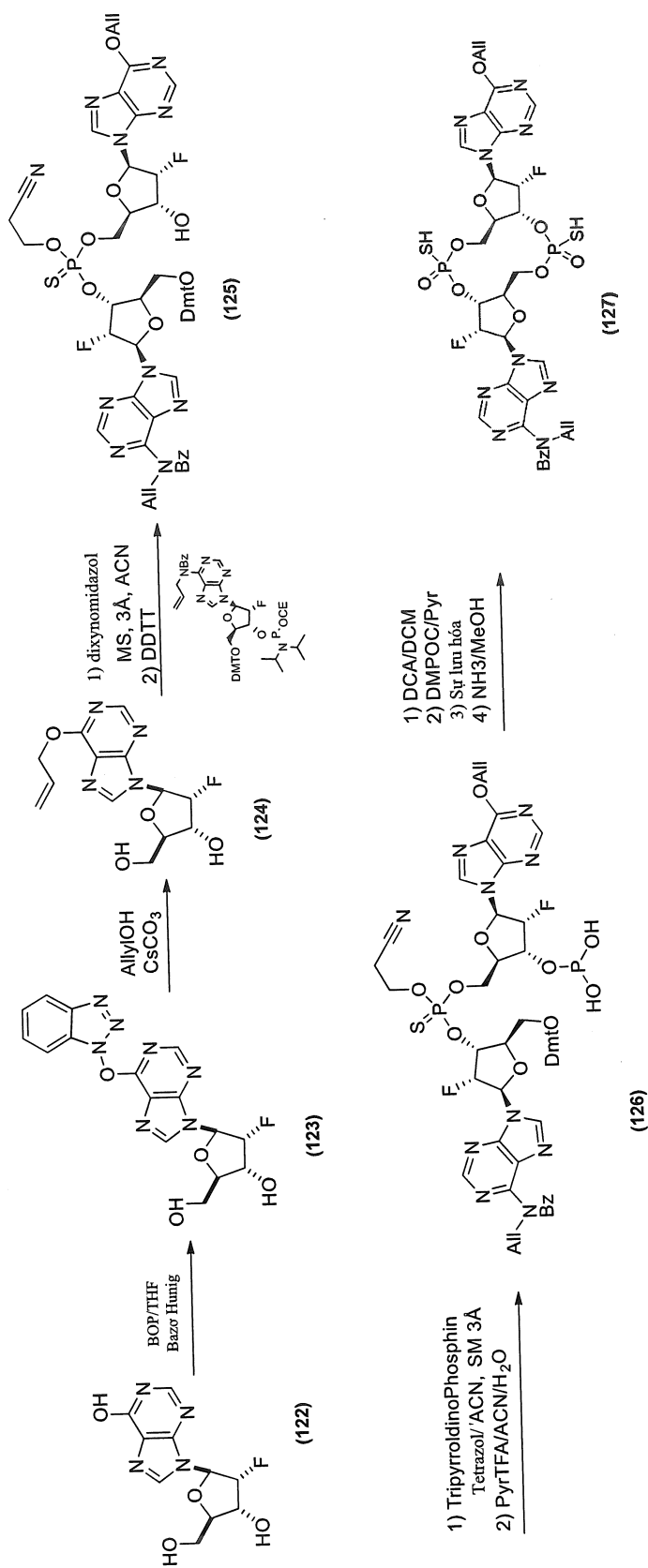
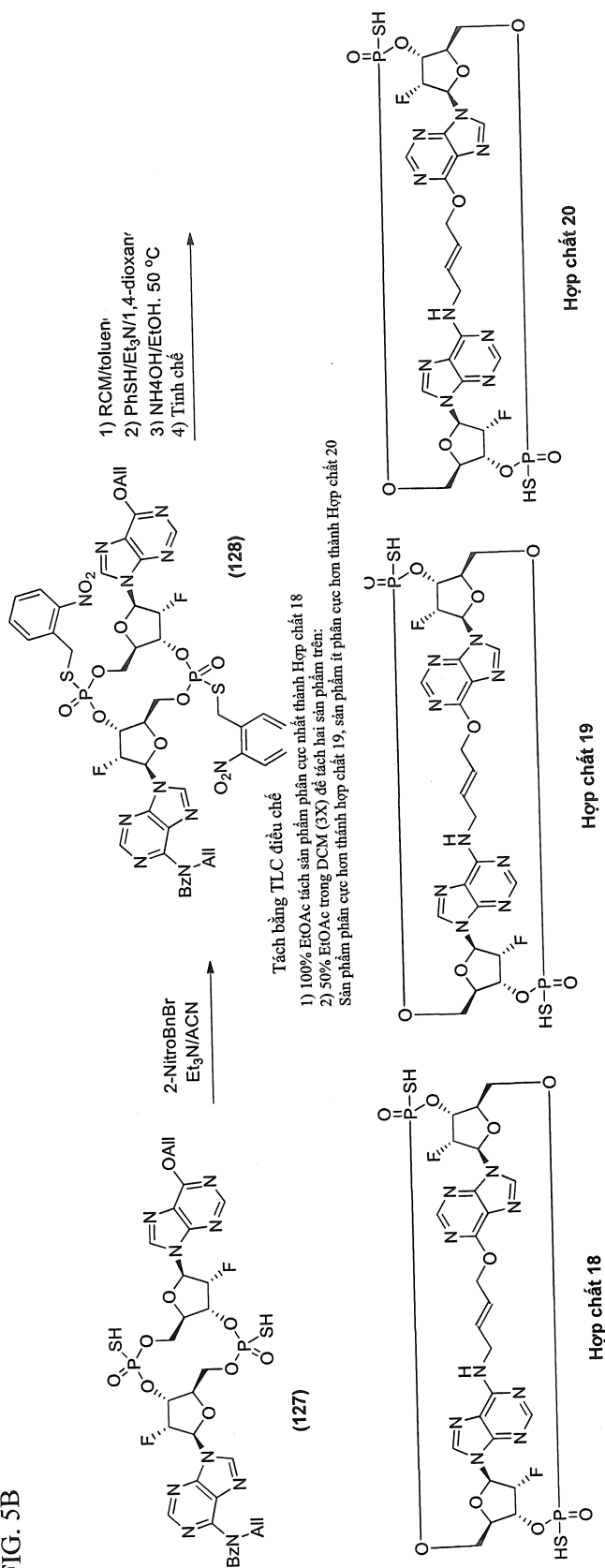


FIG. 5B



14/21

FIG. 6

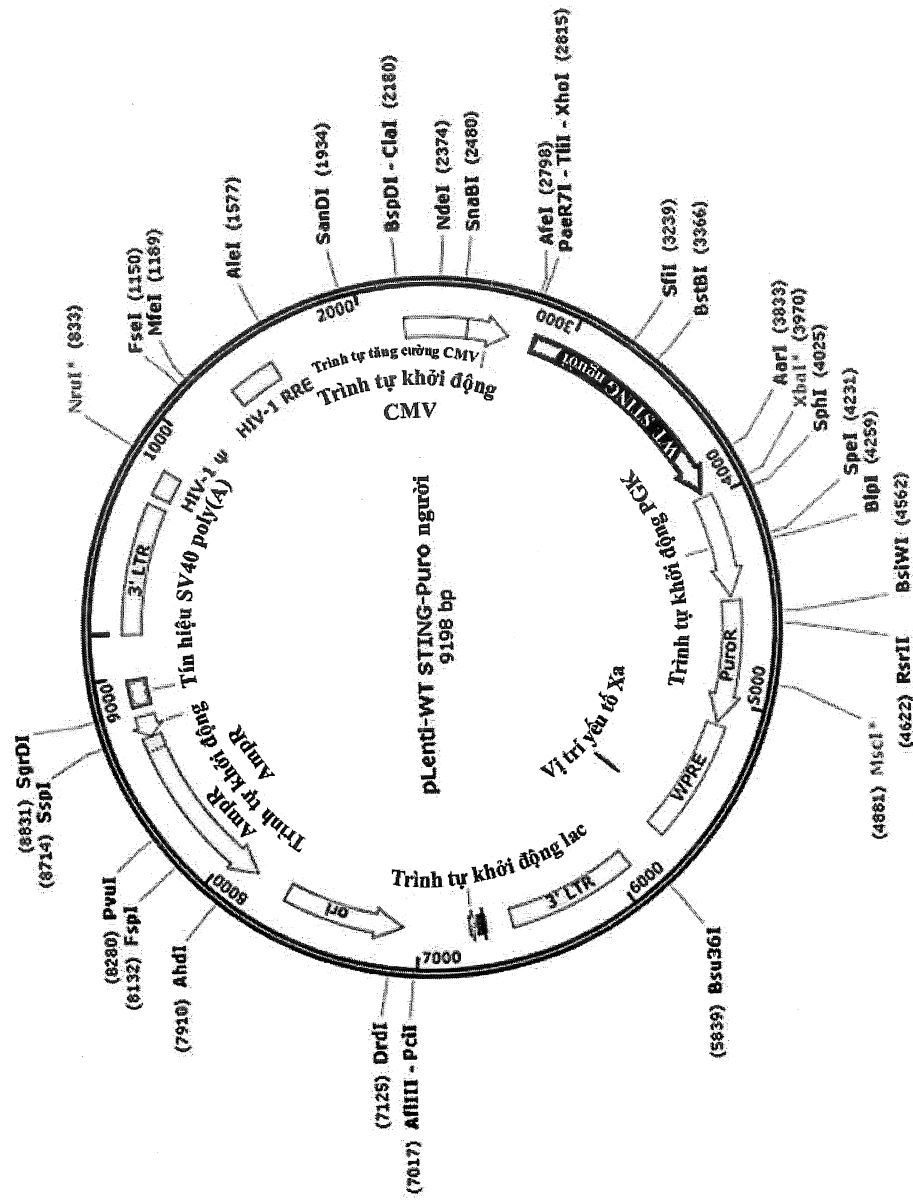
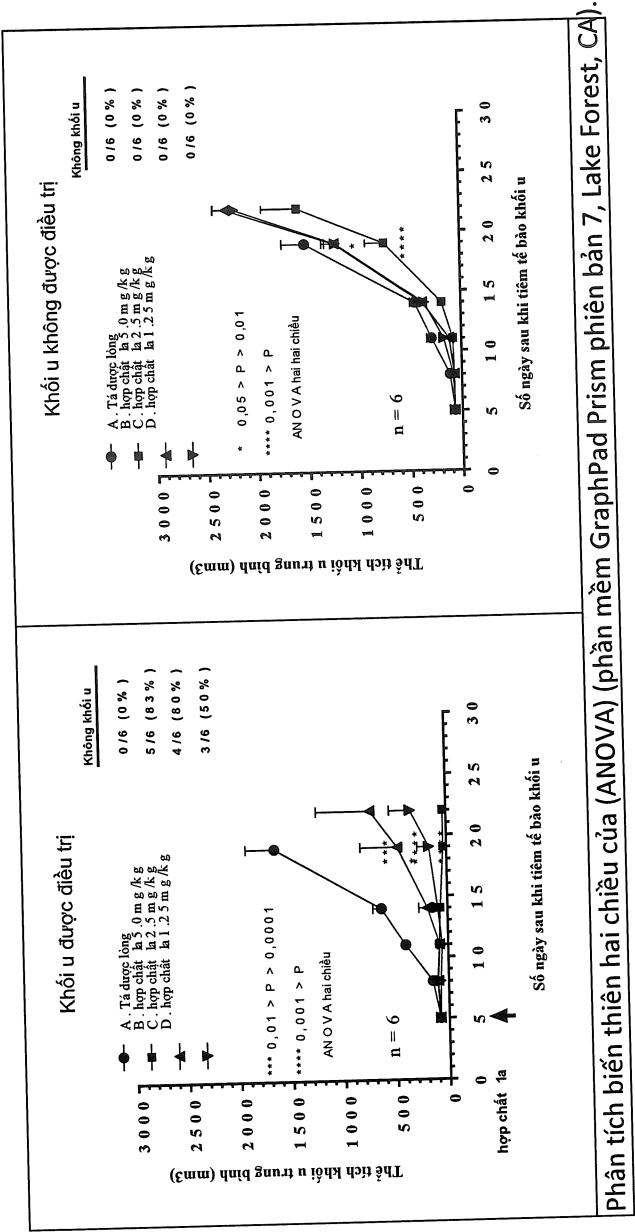


FIG. 7: Đồ thị thể tích khối u của nghiên cứu A đối với khối u được điều trị và không được điều trị



Phân tích biến thiên hai chiều của (ANOVA) (phần mềm GraphPad Prism phiên bản 7, Lake Forest, CA).

FIG. 9 Đồ thị thể tích khối u đối với các khối u se được điều trị và đường cong sống sót

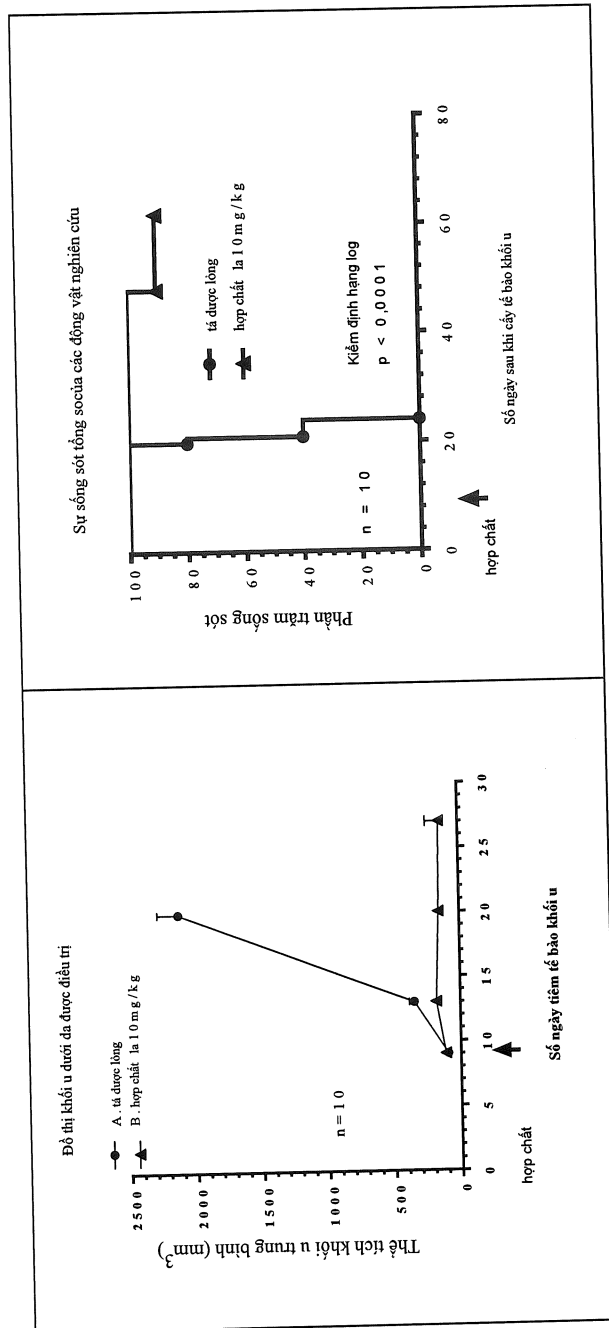
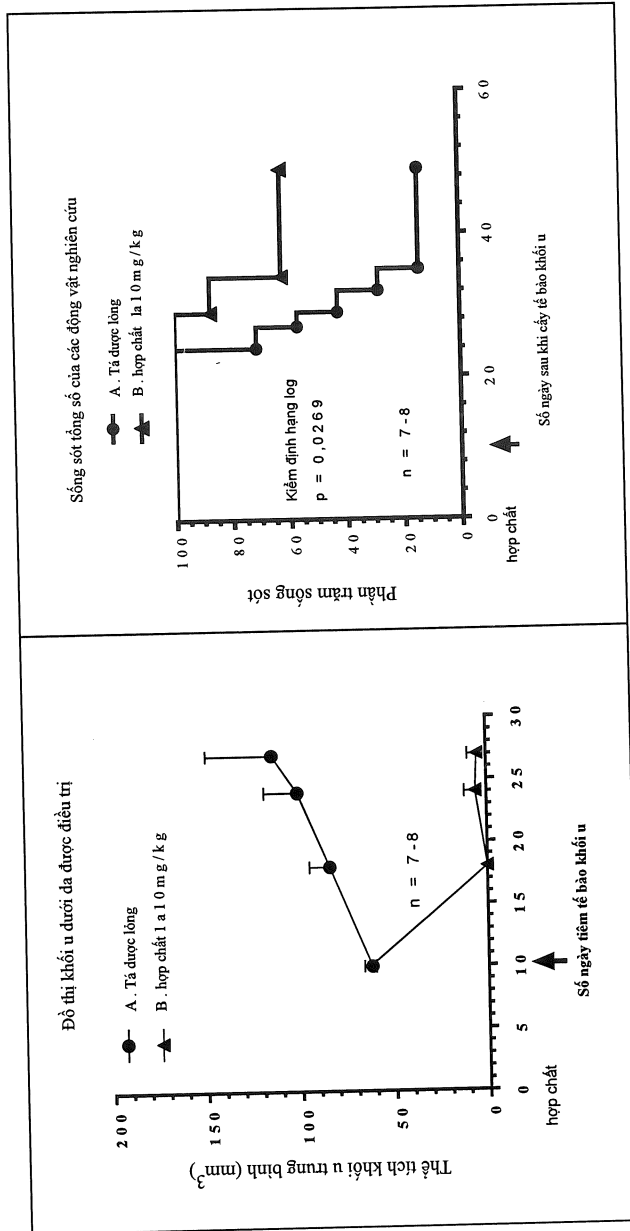


FIG. 10 Đồ thị thể tích khối u cho các khối u sc được điều trị và đường cong sống sót



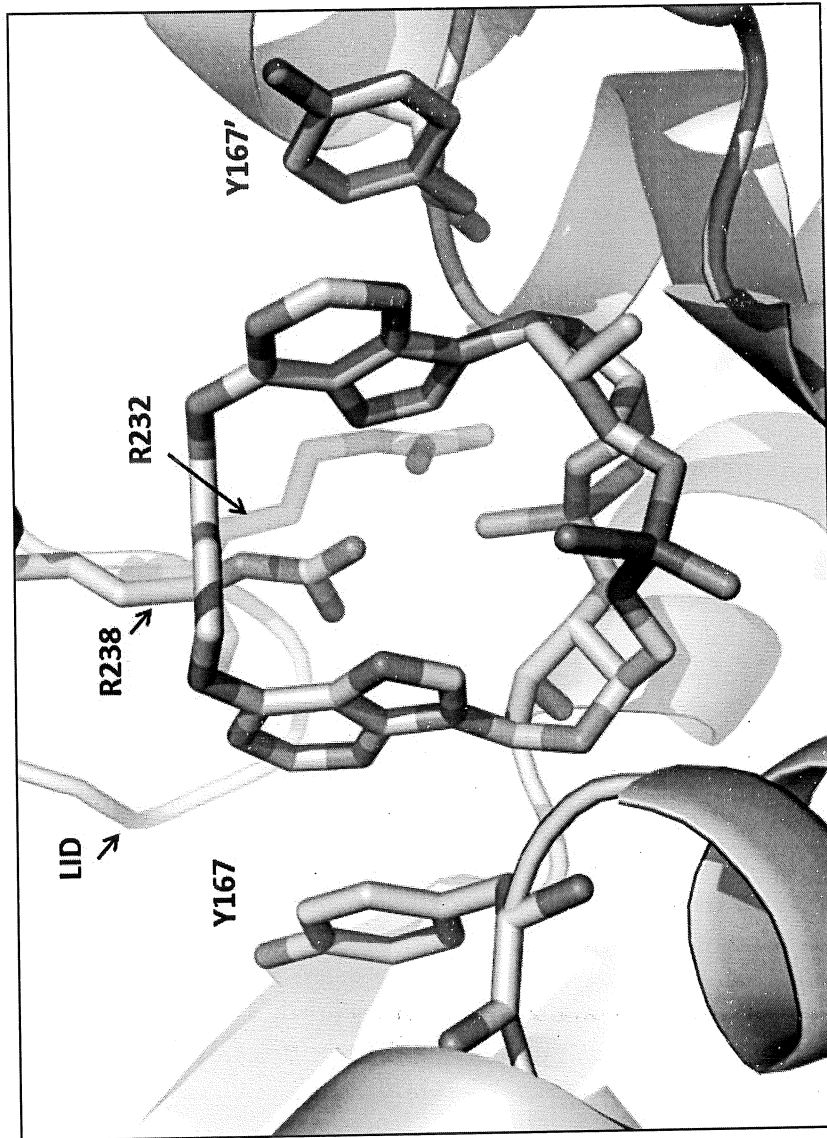


FIG. 11

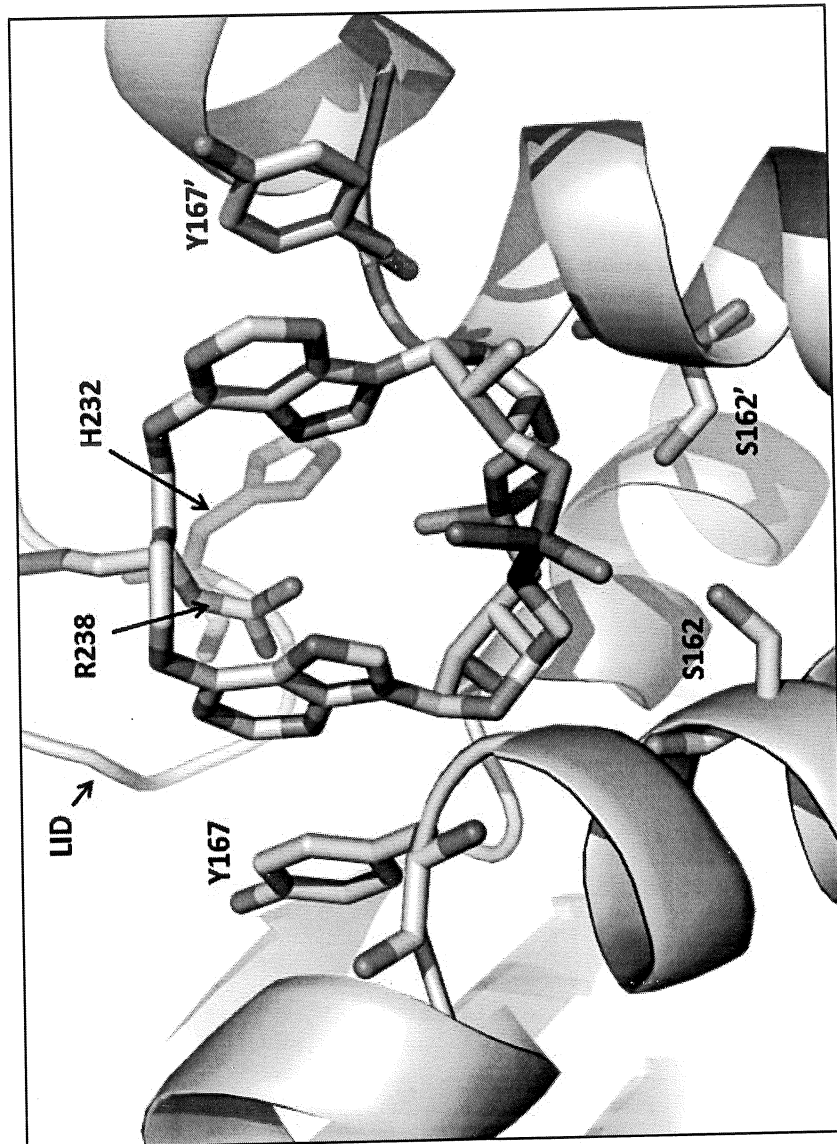


FIG. 12

FIG. 13

