



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ 1-0051496
(51)^{2020.01} C07F 9/6558; C07H 21/00; C07F (13) B
9/6561; A61K 31/713
-

- (21) 1-2022-02065 (22) 05/08/2016
(62) 1-2018-00923
(86) PCT/US2016/045876 05/08/2016 (87) WO2017/024264 09/02/2017
(30) 62/201,510 05/08/2015 US
(45) 25/09/2025 450 (43) 27/06/2022 411A
(73) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)
6-10, Koishikawa 4-Chome Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8088, Japan
(72) ENDO, Atsushi (US); YU, Robert T. (US); FANG, Francis (US); CHOI, Hyeon
Wook (KR); SHAN, Mingde (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) HỢP CHẤT GẦN NHƯ TINH KHIẾT VỀ MẶT ĐỒNG PHẦN KHÔNG ĐỐI
QUANG, CHẾ PHẨM GẦN NHƯ TINH KHIẾT VỀ MẶT ĐỒNG PHẦN KHÔNG
ĐỐI QUANG CHỨA HỢP CHẤT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ
OLIGONUCLEOTIT TINH KHIẾT VỀ MẶT HÓA HỌC LẬP THỂ

(21) 1-2022-02065

(57) Sáng chế đề xuất phosphoramidocloridat morpholino nucleosit có hoạt tính tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang hoặc gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang, và các phương pháp điều chế chúng.

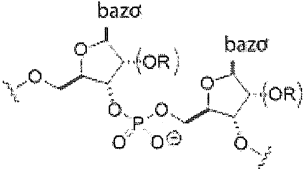
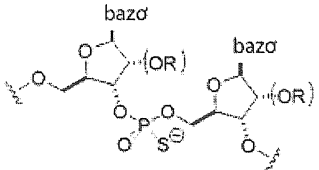
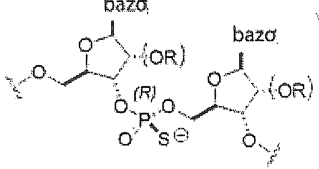
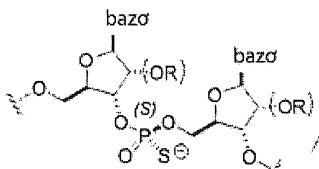
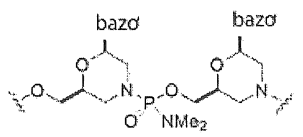
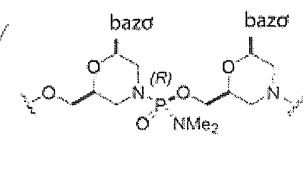
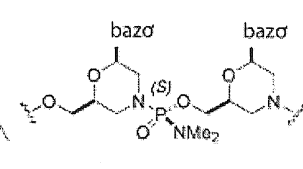
Oligonucleotit điều trị		
Oligome phosphodiester (ADN, ARN, v.v.)	Oligome phosphothioat (PS)	Oligome morpholino phosphodiamidat (PMO)
	  	  
Phospho đối xứng	Phospho bất đối xứng	

FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế các monome có hoạt tính gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang mà là các tập con của phosphoramidocloridat morpholino. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các monome morpholino được phosphoryl hóa có hoạt tính gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang để điều chế các phân tử thông qua phản ứng ghép đặc thù lập thể.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quy trình tổng hợp phosphodiamidat oligonucleotit tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang phức tạp về cơ bản là do sự có mặt liên kết phospho bất đối xứng. Quy trình tổng hợp này trái ngược với, ví dụ, liên kết phosphodiester, mà không có phospho bất đối xứng. Các ví dụ có thể được tìm thấy trên FIG. 1, khi so sánh phosphodiester, phosphothioat (mà còn bao gồm phospho bất đối xứng), và phosphodiamidat.

Sự có mặt của phospho bất đối xứng thể hiện thử thách lớn đối với các phương pháp tổng hợp bao gồm liên kết của một loạt phosphodiamidat nucleotit. Việc thiếu chất phản ứng tinh khiết về mặt hóa học lập thể (mẫu, tập con, đơn thể) mà có thể tạo thành liên kết phosphodiamidat đặc thù lập thể dẫn đến phản ứng ở tâm lập thể, trong đó tính bất đối phospho của hợp chất thu được không thể điều chỉnh được.

Như được thể hiện bằng sơ đồ trên FIG. 2, việc sử dụng hỗn hợp đồng phân không đối quang của nucleotit để ghép không điều chỉnh về mặt hóa học lập thể tạo ra oligonucleotit có chiều dài và trình tự bất kỳ đáng kể tạo ra hỗn hợp không đồng nhất chứa nhiều chất đồng phân không đối quang. Số chất đồng phân không đối quang bằng $2^{(n-1)}$ về mặt lý thuyết, trong đó n là số nucleotit được liên kết để tạo thành oligonucleotit. Như được thể hiện trên FIG. 2, ngay cả oligonucleotit có bốn nucleotit (tetranucleotit) bình thường có thể tạo thành hỗn hợp chứa tám chất đồng phân không đối quang riêng rẽ.

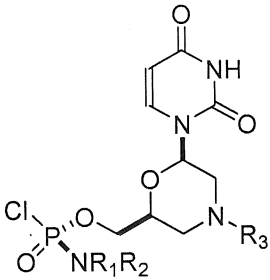
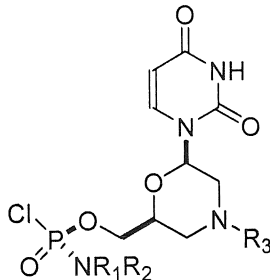
Việc tạo thành số lượng đáng kể các chất đồng phân không đối quang có thể dẫn đến nhu cầu về kỹ thuật tách chính xác sau khi tổng hợp. Hiệu suất sản phẩm mong muốn có thể bị ảnh hưởng bất lợi do sử dụng nguyên liệu thô tạo ra nhiều chất đồng phân không đối quang không mong muốn.

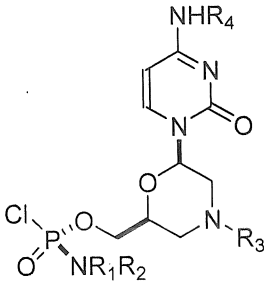
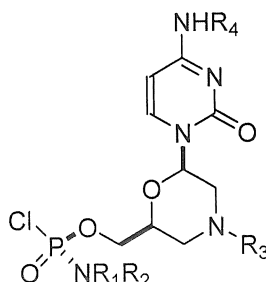
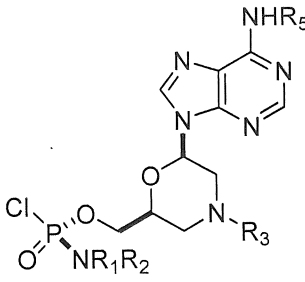
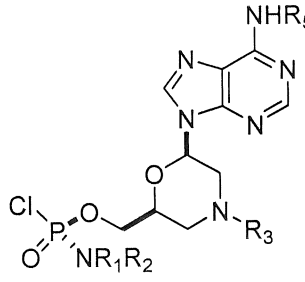
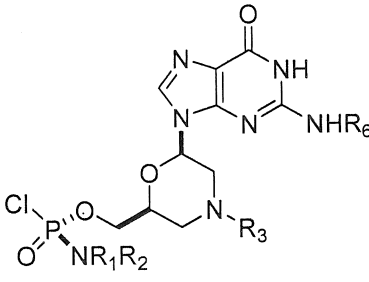
Có thể là hữu dụng khi lựa chọn chất đồng phân không đối quang cụ thể trước khi tổng hợp, sau đó tổng hợp chất đồng phân không đối quang đã chọn ở dạng tinh khiết hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể.

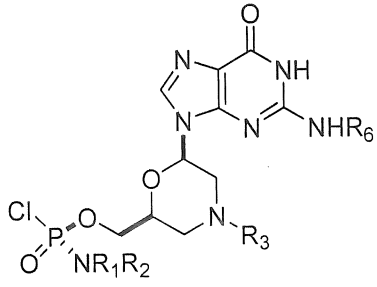
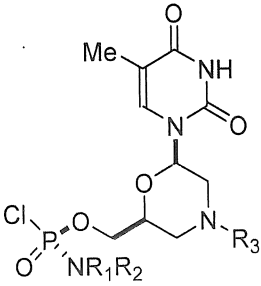
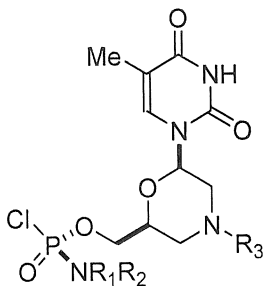
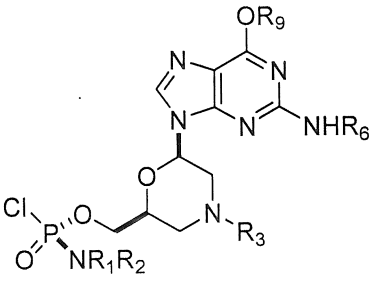
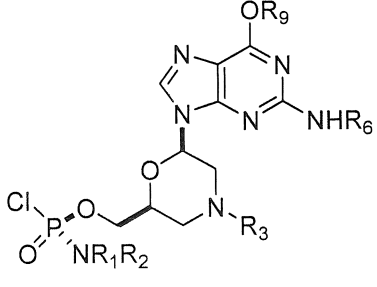
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến một hoặc nhiều hợp chất tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể nêu trong Bảng 1. Sáng chế còn đề cập đến các chất đồng phân đối ảnh của các hợp chất trong Bảng 1. Thông thường, hóa học lập thể của các chất đồng phân đối ảnh này thay đổi so với hóa học lập thể của các hợp chất trong Bảng 1 do thay đổi hóa học lập thể của vòng morpholino.

Bảng 1

Hợp chất	Công thức #
	20
	21

	22
	23
	24
	25
	26

	27
	28
	29
	30
	31

R_1 và R_2 có thể là giống hoặc khác nhau, và có thể là -H, C1-C3 alkyl được thế tùy ý, phenyl được thế tùy ý, naphthyl được thế tùy ý, hoặc, với nitơ mà chúng gắn kết, tạo thành dị vòng được thế tùy ý, mà có thể là, ví dụ, pyrrolidin, piperazin, hoặc morpholin.

Các nhóm được thế tùy ý có thể được thế bằng một hoặc nhiều nhóm trong số methyl, ethyl, halogen, nitro, metoxy, hoặc xyano.

R_3 có thể là trityl (Tr), mà có thể là trityl được thế, bao gồm nhưng không giới hạn ở MMTr (p-metoxyphenyldiphenylmethyl), benzyl được thế tùy ý, 4-metoxybenzyl (PMB, MPM), 3,4-dimetoxybenzyl, diphenylmethyl (Dpm), hoặc sulfonyl, mà có thể là sulfonyl tách ra được. Theo một số phương án, sulfonyl là 2-nitrobenzensulfonyl, 4-nitrobenzensulfonyl, hoặc 2,4-dinitrobenzensulfonyl.

R_4 , R_5 , R_6 có thể là -H, $-C(O)R_7$, hoặc $-C(O)OR_7$, trong đó R_7 là alkyl (methyl, ethyl, isopropyl, hoặc C1-C6 alkyl khác), benzyl, 2,2,2-tricloethyl, hoặc aryl (bao gồm nhưng không giới hạn ở phenyl, 4-metoxy phenyl, 4-bromophenyl, và 4-nitrophenyl). R_9 có thể là alkyl được thế tùy ý, xyanoethyl, axyl, carbonat, carbamat, benzyl được thế tùy ý, 4-pivaloyloxy benzyl, và silyl.

Theo các phương án khác, ngoài các hợp chất nêu trong Bảng 1, các morpholino nucleosit có thể được điều chế ở dạng tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang hoặc gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để tách hỗn hợp đồng phân không đối quang của các hợp chất nêu trên thành các hợp chất tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể. Các phương án khác có thể đề xuất được phẩm chứa các hợp chất tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể như được nêu ở đây. Các phương án khác có thể đề xuất được phẩm chứa muối được dùng của các hợp chất tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể như được nêu ở đây. Dược phẩm có thể được dùng ở lượng hữu hiệu cho bệnh nhân cần điều trị. Dược phẩm có thể còn bao gồm chất mang được dùng.

Theo một số phương án, nhóm sau trong mỗi hợp chất nêu trong Bảng 1 có thể được thế bằng một hoặc hai nhóm methyl ở các vị trí a, b, và e, và có thể được thế bằng một nhóm methyl ở các vị trí c và d. Trong từng trường hợp, nhóm methyl có thể hướng về cả hai phía của mặt phẳng của vòng morpholino. Theo các phương án khác, metylen bổ sung, tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm methyl, có thể được chen vào sát cạnh nitơ trong nhóm morpholino để mở rộng vòng bảy cạnh.

Sáng chế còn đề xuất quy trình điều chế oligonucleotit tinh khiết về mặt hóa học lập thể bằng cách ghép đặc thù lập thể các monome hoạt tính. Các phương án khác đề xuất oligome gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang được tạo thành bằng cách ghép đặc thù lập thể các monome hoạt tính. Các phương án khác nữa đề xuất các chế phẩm gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang chứa hợp chất gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang như được nêu ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện các liên kết phosphodiester, phosphothioat, và phosphodiamidat oligonucleotit.

FIG. 2 thể hiện các liên kết R- và S- phospho trong oligome morpholino phosphodiamidat (PMO). FIG. 2 còn thể hiện sự tăng sinh của chất đồng phân không đối quang mà thường xảy ra khi hỗn hợp đồng phân không đối quang của tiền chất oligome phosphodiamidat được sử dụng để tổng hợp dinucleotit (2-me), trinucleotit (3-me), tetranucleotit (4-me), và N-me.

FIG. 3 thể hiện quy trình điều chế dinucleotit tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang bằng cả hai cách là sử dụng phosphoramidocloridat tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang và sử dụng hỗn hợp đồng phân không đối quang của phosphoramidocloridat.

FIG. 4A và FIG. 4B thể hiện hỗn hợp đồng phân không đối quang phổ biến của phosphoramidocloridat mà có thể là hữu dụng để điều chế các tập con đồng phân không đối quang tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang hoặc gần như tinh khiết về mặt

đồng phân không đối quang.

FIG. 5 thể hiện quy trình điều chế oligonucleotit tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang (đồng nhất) sử dụng phosphoramidocloridat tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang như được nêu ở đây.

FIG. 6 thể hiện sơ đồ quy trình tổng hợp 16-me PMO đặc thù lập thể và sự phân biệt các chất đồng phân lập thể bằng thử nghiệm lý sinh.

FIG. 7 thể hiện nhiệt độ nóng chảy của các chất đồng phân lập thể 1 và 2 của ví dụ thể hiện quy trình tổng hợp 16-me PMO đặc thù lập thể và sự phân biệt các chất đồng phân lập thể bằng thử nghiệm lý sinh, như nêu dưới đây.

FIG. 8 thể hiện sơ đồ ORTEP của hợp chất 100 ở dạng tinh thể, như nêu dưới đây.

FIG. 9A và FIG. 9B thể hiện sơ đồ ORTEP của hai đoạn của hợp chất 100, như nêu dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đã phát hiện ra rằng hai chất đồng phân không đối quang của các tập con morpholino hoạt tính có thể được phân loại dựa vào các tính chất vật lý của chúng, để điều chế các chất đồng phân tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang. Việc này cho phép điều chế các PMO tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể trong điều kiện phản ứng được kiểm soát, mà sau đó có thể được sử dụng để điều chế chọn lọc oligonucleotit với hóa học lập thể mong muốn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế hỗn hợp đồng phân không đối quang của các hợp chất bộc lộ ở trên thành các hợp chất tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể. Khi tách, chất đồng phân không đối quang tinh khiết từ hỗn hợp đồng phân không đối quang trước đó có thể được sử dụng để điều chế các hợp chất tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang thông qua phản ứng ghép đặc thù lập thể.

Các hợp chất tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang và các hợp chất gần

như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang được điều chế như nêu ở đây có thể là phosphodiamidat oligonucleotit tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang. Phosphodiamidat oligonucleotit tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang và gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang có thể có nhiều cách dùng. Ví dụ, chúng có thể là hữu dụng làm dược phẩm. Chúng có thể được chọn dựa vào các tính chất mà tốt hơn so với các tính chất của hỗn hợp không đồng nhất (hỗn hợp lập thể-ngẫu nhiên) của chất đồng phân không đối quang của phosphodiamidat oligonucleotit. Ví dụ, chúng có thể được chọn dựa vào sự khác nhau về hiệu lực, hiệu quả, độ ổn định, độ an toàn, và tính đặc hiệu. Oligome tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang và gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang có thể có các tính chất vật lý, hoá học, và sinh học mà khác với các tính chất của các hỗn hợp oligome không đồng nhất về mặt hoá học lập thể.

“Chất đồng phân lập thể” là nói đến các chất đồng phân mà chỉ khác nhau về sự sắp xếp các nguyên tử trong không gian.

“Chất đồng phân không đối quang” là nói đến các chất đồng phân lập thể mà không phải là hình đối xứng qua gương của nhau.

“Chất đồng phân đối ảnh” là nói đến các chất đồng phân lập thể mà ảnh đối xứng gương của chúng không chồng khít với nhau. Chất đồng phân đối ảnh bao gồm chất đồng phân “tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh” bao gồm về cơ bản là chất đồng phân đơn nhất, ví dụ, nhiều hơn hoặc bằng 90%, 92%, 95%, 98%, hoặc 99%, hoặc bằng 100% chất đồng phân đối ảnh đơn nhất.

“Monome hoạt tính” là nói đến các tập con morpholino được phosphoryl hoá 5'-O- mang phospho phản ứng có nhóm rời chuyển, bao gồm nhưng không giới hạn ở clorua và nhóm rời chuyển halogenua, mà trải qua phản ứng thay thế bằng chất cho điện tử, bao gồm nhưng không giới hạn ở amin và rượu.

“R” và “S” là các thuật ngữ mô tả các chất đồng phân, là ký hiệu của cấu hình hoá học lập thể tại các nguyên tử được thể không đối xứng, bao gồm nhưng không giới hạn ở: cacbon, lưu huỳnh, phospho và amoni nitơ. Ký hiệu của nguyên tử được thể không đối xứng là “R” hoặc “S” được thực hiện theo quy tắc ưu tiên Cahn-Ingold-Prelog, là quy tắc

mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ, và được mô tả trong tài liệu Danh pháp hoá học theo Liên minh Quốc tế về hoá học thuần túy và hoá học ứng dụng (the International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC) đối với danh pháp của ngành hoá học hữu cơ. Phần E, Hoá học lập thể.

Chất đồng phân đối ảnh có thể được đặc trưng bởi hướng mà nó quay trên mặt phẳng ánh sáng phân cực, là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hoá học. Nếu nó quay theo chiều kim đồng hồ (đối với hướng của người nhìn khi ánh sáng đang dịch chuyển), thì chất đồng phân đối ảnh được đánh dấu (+), và được chỉ ra là quay phải. Ảnh đối xứng gương của nó sẽ quay trên mặt phẳng ánh sáng phân cực theo hướng ngược chiều kim đồng hồ, và được đánh dấu (–), hoặc quay trái. Hướng quay của mặt phẳng ánh sáng phân cực theo hợp chất tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh, gọi là ký hiệu quay quang, có thể dễ dàng được đo bằng dụng cụ tiêu chuẩn đã biết là phân cực kế.

“Raxemic” là nói đến hỗn hợp chứa các phần bằng nhau của các chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ.

“Không-raxemic” là nói đến hỗn hợp chứa các phần không bằng nhau của các chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ. Hỗn hợp không-raxemic có thể được làm giàu ở cấu hình R hoặc S, bao gồm, không giới hạn, hỗn hợp chất đồng phân đối ảnh R đối với S, hoặc S đối với R ở tỷ lệ khoảng 50/50, khoảng 60/40, và khoảng 70/30.

“Gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể” và “mức độ gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể” là nói đến chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang mà lượng dư đồng phân đối ảnh hoặc lượng dư đồng phân không đối quang, tương ứng, bằng hoặc lớn hơn 80%. Theo một số phương án, “gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể” và “mức độ gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể” là nói đến chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang mà lượng dư đồng phân đối ảnh hoặc lượng dư đồng phân không đối quang, tương ứng, bằng hoặc lớn hơn 87%, bằng hoặc lớn hơn 90%, bằng hoặc lớn hơn 95%, bằng hoặc lớn hơn 96%, bằng hoặc lớn hơn 97%, bằng hoặc lớn hơn 98%, hoặc bằng hoặc lớn hơn 99%. “Gần như tinh khiết về mặt đồng phân

không đối quang" là nói đến chất đồng phân không đối quang mà lượng dư đồng phân không đối quang bằng hoặc lớn hơn 87%, bằng hoặc lớn hơn 90%, bằng hoặc lớn hơn 95%, bằng hoặc lớn hơn 96%, bằng hoặc lớn hơn 97%, bằng hoặc lớn hơn 98%, hoặc bằng hoặc lớn hơn 99%.

“Lượng dư đồng phân đối ảnh” (enantiomeric excess - ee) của chất đồng phân đối ảnh là [(tỷ lệ mol của chất đồng phân đối ảnh chính) trừ (tỷ lệ mol của chất đồng phân đối ảnh phụ)] $\times$ 100. Lượng dư đồng phân không đối quang (diastereomeric excess - de) của chất đồng phân không đối quang trong hỗn hợp hai chất đồng phân không đối quang được xác định theo cách tương tự.

“Muối được dụng” như được sử dụng ở đây đề cập đến muối cộng axit hoặc muối cộng bazơ của hợp chất trong bản mô tả. Muối được dụng là muối bất kỳ mà giữ hoạt tính của hợp chất gốc và không gây ra tác động có hại quá mức hoặc tác động không mong muốn lên đối tượng là người được dùng và trong phạm vi muối này được dùng. Muối được dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phức kim loại và các muối của cả axit vô cơ và axit carboxylic. Muối được dụng còn bao gồm các muối kim loại như muối nhôm, muối canxi, muối sắt, muối magie, muối mangan và các muối phức. Ngoài ra, muối được dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối axit như axetic, aspartic, alkylsulfonic, arylsulfonic, axetil, benzensulfonic, benzoic, bicarbonic, bisulfuric, bitartaric, butyric, canxi edetat, camsylic, carbonic, clobenzoic, xitric, edetic, edisylic, estolic, esyl, esylic, formic, fumaric, gluceptic, gluconic, glutamic, glycolic, glycolylarsanilic, hexamic, hexylresorcinoic, hydrabamic, bromhydric, clohydric, iodhydric, 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, tanic, tartaric, teoclic, toluensulfonic, và các muối tương tự.

"Lượng hiệu quả" của tổ hợp chất điều trị (ví dụ, hợp chất 1 và chất ức chế CDK 4/6) là lượng đủ để tạo ra lợi ích điều trị đáng kể so với HCC hoặc IHCC chưa được điều

trị ở đối tượng hoặc bệnh nhân.

Các hoạt chất như được nêu ở đây có thể được kết hợp với chất mang được dùng để tạo ra dược phẩm. Việc lựa chọn chất mang và dạng bào chế cụ thể sẽ phụ thuộc vào cách dùng cụ thể mà chế phẩm hướng đến.

“Chất mang được dùng” như được sử dụng ở đây đề cập đến chất mang không độc, chất phụ trợ, hoặc chất dẫn thuốc mà không phá hủy hoạt tính dược lý của hợp chất được bào chế. Các chất mang được dùng, chất phụ trợ hoặc chất dẫn thuốc mà có thể được sử dụng trong các chế phẩm của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit sorbic, kali sorbat, một phần hỗn hợp glyxerit của axit béo thực vật bão hòa, nước, muối hoặc chất điện phân, dinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, silic oxit keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrrolidon, chất gốc xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, polyetylen glycol và mỡ cừu.

Chế phẩm theo sáng chế có thể là thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa, qua đường miệng, xông hít, dùng tại chỗ, trực tràng, mũi, trong miệng, âm đạo hoặc dùng trong khoang cấy ghép, v.v.. Theo một số phương án, dạng bào chế chứa các thành phần có nguồn gốc tự nhiên hoặc không phải tự nhiên. Theo một số phương án, dạng bào chế hoặc chất mang có thể được chuẩn bị ở dạng vô trùng. Ví dụ không giới hạn về chất mang vô trùng bao gồm nước không chứa nội độc tố hoặc nước không chứa pyrogen.

Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” như được sử dụng ở đây bao gồm các kỹ thuật tiêm hoặc truyền dưới da, trong tĩnh mạch, tiêm bắp, trong khớp, trong bao hoạt dịch, trong xương ức, trong vỏ, trong gan, trong thương tổn và trong sọ. Theo các phương án cụ thể, các hợp chất được dùng trong tĩnh mạch, qua đường miệng, dưới da, hoặc dùng tiêm bắp. Các dạng tiêm được vô trùng của chế phẩm theo sáng chế có thể là huyền phù nước hoặc huyền phù dầu. Các huyền phù này có thể được bào chế theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này sử dụng chất phân tán hoặc chất thấm ướt và chất tạo huyền phù thích hợp. Chế phẩm tiêm được vô trùng cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù tiêm được vô trùng trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc được chấp nhận dùng ngoài đường tiêu hóa. Các chất dẫn thuốc và dung môi được chấp nhận mà có thể được

dùng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi, vô trùng thường được dùng làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù.

Các phương án theo sáng chế đề xuất quy trình điều chế chất đồng phân tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc chất đồng phân gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể, tiếp đó sử dụng các chất đồng phân tinh khiết để điều chế đặc thù lập thể các oligome morpholino phosphodiamidat (phosphorodiamidate morpholino oligomers - PMOs) tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang. Quy trình điều chế có thể được thực hiện bằng cách tách hỗn hợp đồng phân không đối quang của phosphoramidocloridat nucleotit. Bước tách này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, sắc ký; ví dụ, sắc ký lỏng cao áp hoặc "HPLC". Bước tách cũng có thể được thực hiện bằng cách kết tinh.

Các monome đã tách có thể được gọi là các monome "hoạt tính". "Hoạt tính" nghĩa là các monome bao gồm nhóm phosphoramidocloridat mà phản ứng với nhiều chất cho điện tử, mà bao gồm nhưng không giới hạn ở: amin, rượu/alkoxit, thiol/thiolat, alkylithi, và chất phản ứng Grignard.

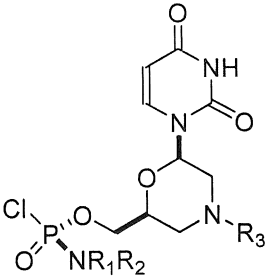
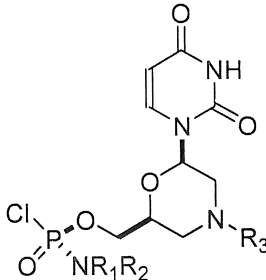
I. Điều chế chất đồng phân không đối quang

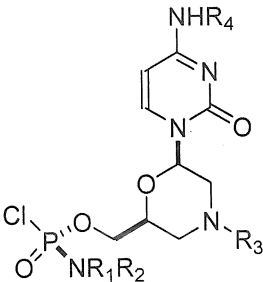
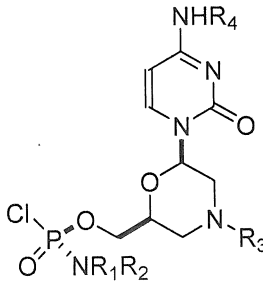
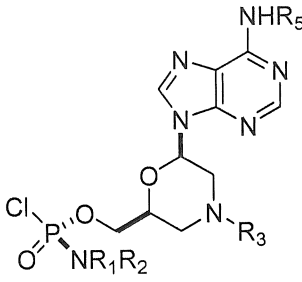
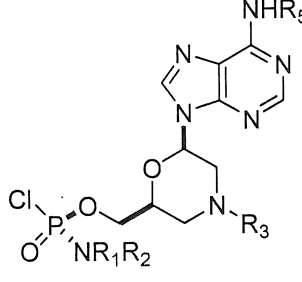
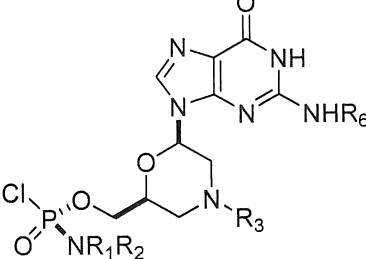
Theo một phương án, các monome có hoạt tính tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể có thể được điều chế bằng cách tách hỗn hợp đồng phân không đối quang của các monome. Bước tách có thể được thực hiện bằng các phương pháp cho phép phân biệt các chất đồng phân lập thể sử dụng các tính chất vật lý. Ví dụ, bước tách có thể được thực hiện bằng cách sắc ký hoặc kết tinh. Các loại sắc ký thích hợp bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn ở sắc ký lỏng cao áp (high performance liquid chromatography - HPLC), sắc ký giả chuyển động, sắc ký dòng ngược, và các loại sắc ký phân tách khác. Ví dụ, hỗn hợp đồng phân không đối quang có thể được đưa vào HPLC, rửa giải phần chuyển động nhanh và phần chuyển động chậm. Mỗi phần có lượng monome tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể là khác nhau. Như được mô tả dưới đây, các monome này có thể được sử dụng để điều chế các oligome có hóa học lập thể mong muốn bằng cách ghép đặc thù lập thể sử dụng các điều kiện phản ứng được kiểm soát.

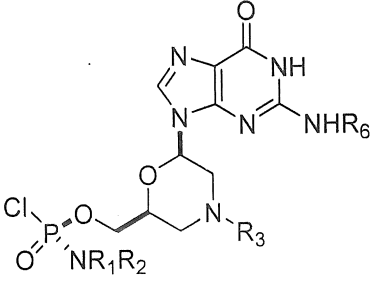
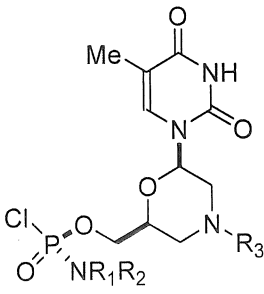
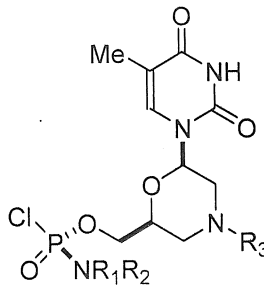
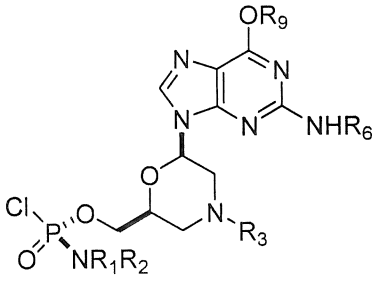
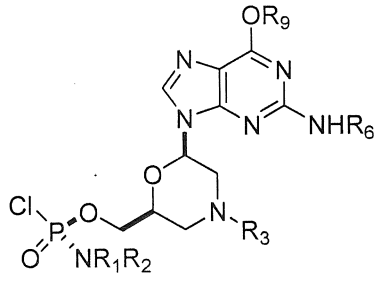
Các tác giả sáng chế còn xác định được, khi tách, các monome có hoạt tính tinh khiết về mặt hóa học lập thể có độ ổn định đủ để sử dụng trong các phản ứng hóa học khác. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã xác định được các monome có hoạt tính tinh khiết về mặt hóa học lập thể có thể trải qua phản ứng hóa học đặc thù lập thể. Do đó, như được thảo luận chi tiết dưới đây, các monome có hoạt tính tinh khiết về mặt hóa học lập thể này có thể được sử dụng cho phản ứng ghép đặc thù lập thể để tạo ra các sản phẩm tinh khiết về mặt hóa học lập thể.

Như đã nêu ở trên, các phương án của sáng chế có thể đề xuất một hoặc nhiều hợp chất tinh khiết về mặt hóa học lập thể hoặc gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể nêu trong Bảng 1, mà có thể được điều chế bằng cách tạo ra các đặc điểm thuận lợi trong số các tính chất vật lý khác nhau của các chất đồng phân lập thể. Các phương án khác cũng có thể tạo ra các chất đồng phân đối ảnh của các hợp chất nêu trong Bảng 1. Hóa học lập thể của các chất đồng phân đối ảnh này thường khác với hóa học lập thể của các hợp chất trong Bảng 1 do sự thay đổi hóa học lập thể của vòng morpholino.

Bảng 1

Hợp chất	Công thức #
	20
	21

	22
	23
	24
	25
	26

	27
	28
	29
	30
	31

trong đó R3 là triphenylmetyl được thế tùy ý (còn gọi là "trityl"), benzyl được thế tùy ý, hoặc sulfonyl. R4, R5, và R6 có thể là $-C(O)R7$ hoặc $-C(O)OR8$, trong đó R7 là metyl, etyl, hoặc phenyl, và R8 là benzyl hoặc 2,2,2-tricloetyl. R9 có thể là alkyl được thế tùy ý, xianoetyl (để sử dụng làm nhóm bảo vệ, xem ví dụ, công bố đơn Mỹ số US2013/0197220), axyl, sulfonyl, axetal/ketal, carbonat, carbamat, benzyl được thế tùy ý, 4-pivaloyloxy benzyl, và silyl.

Theo một số phương án, benzyl được thế tùy ý là 4-metoxybenzyl (PMB, MPM). Theo một số phương án, sulfonyl là sulfonyl có thể tách ra. Theo một số phương án, sulfonyl là 2-nitrobenzensulfonyl, 4-nitrobenzensulfonyl, hoặc 2,4-dinitrobenzensulfonyl.

R1 và R2 có thể là giống hoặc khác nhau, và có thể là -H, C1-C3 alkyl được thế tùy ý, phenyl được thế tùy ý, naphtyl được thế tùy ý, hoặc, với nitơ mà chúng gắn kết, tạo thành dị vòng được thế tùy ý, mà có thể là, ví dụ, pyrrolidin, piperazin, hoặc morpholin.

Các nhóm được thế tùy ý có thể được thế bằng một hoặc nhiều nhóm trong số metyl, etyl, halogen, nitro, hoặc xiano.

R3 có thể là trityl (Tr), mà có thể là trityl được thế, bao gồm nhưng không giới hạn ở MMTr (p-metoxyphenyldiphenylmetyl), benzyl, 4-metoxybenzyl (PMB, MPM), và 3,4-dimetoxybenzyl, diphenylmetyl (Dpm),

R4, R5, R6 có thể là -H, $-C(O)R7$, hoặc $-C(O)OR7$, trong đó R7 là alkyl (metyl, etyl, isopropyl, hoặc C1-C6 alkyl khác) hoặc aryl (bao gồm nhưng không giới hạn ở phenyl, 4-metoxy phenyl, 4-bromophenyl, và 4-nitrophenyl).

II. Ghép đặc thù lập thể

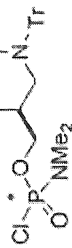
Ngoài việc xác định rằng kỹ thuật tách có thể được sử dụng để tạo ra lượng monome có hoạt tính gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể, các tác giả sáng chế đã xác định rằng các monome hoạt tính này có thể, trong một số điều kiện phản ứng, được sử dụng để tiến hành ghép đặc thù lập thể để điều chế dinucleotit tinh khiết về mặt hóa học lập thể, trinucleotit tinh khiết về mặt hóa học lập thể, và oligome lớn hơn tinh khiết về mặt hóa học lập thể. Nhờ sử dụng các phương pháp nêu ở đây, tính bất đối xứng của

liên kết PMO mới tạo thành có thể được mã hóa đặc hiệu bởi tính bất đối xứng của các monome có hoạt tính tinh khiết về mặt hóa học lập thể sử dụng để tạo thành oligome.

Điều kiện phản ứng thường dùng cho phản ứng ghép đặc thù lập thể bao gồm phản ứng trong dung môi aprotic. Các dung môi này có thể là, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, axetonitril, tetrahydrofuran (THF), 1,3-dimetylimidazolidinon (DMI), dimetylformamit (DMF), N-metyl-2-pyrrolidinon (NMP), dimetylaxetamit (DMAc), diclometan (DCM), 1,2-dicloetan (DCE), cloroform, 1,4-dioxan, etyl axetat, 2-metyltetrahydrofuran, và isopropyl axetat. Phản ứng ghép có thể được thực hiện trong sự có mặt của các bazơ amin bậc ba không cho điện tử và các bazơ thơm. Các bazơ thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, diisopropyletylamin, trietylamin, 2,6-lutidin, trimetylpyridin (collidin), và N-etylmorpholin. Nhiệt độ phản ứng có thể nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng (khoảng 20°C) đến 50°C. Có thể áp dụng khuấy âm trong một số trường hợp để giúp hòa tan (các) chất nền.

Để chứng minh có thể thực hiện được phản ứng ghép đặc thù lập thể, nhiều PMO dinucleotit gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể được điều chế bằng cách ghép PMO đặc thù lập thể đối với các monome có hoạt tính gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể rửa giải nhanh và rửa giải chậm (phosphoramidocloridat). Bảng 2, dưới đây, tổng hợp profin lưu giữ HPLC của các PMO dinucleotit gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể. Bảng này so sánh thời gian lưu của các dinucleotit lấy từ tổ hợp các monome đầu 5' được nêu ở bên trái của bảng với cả chất đồng phân rửa giải nhanh hơn và chậm hơn của các monome đầu 3' nêu ở phía trên của bảng. Bảng này cho thấy phản ứng ghép đặc thù lập thể các monome có hoạt tính gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể tạo ra các dinucleotit tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang khác nhau có các tính chất vật lý khác nhau.

Bảng 2:

Monome hoạt tính (đầu 3'-; chất nhận điện tử)		Bazơ 										
		U		C ^c		A ^d		G ^b		T		
		nhánh U ₁	chậm U ₂	nhánh C ₁	chậm C ₂	nhánh A ₁	chậm A ₂	nhánh G ₁	chậm G ₂	nhánh T ₁	chậm T ₂	
Monome đầu 5'- (chất cho điện tử)	U	UU ₁ 9	< 27	UC ₁ 9,1	UC ₂ > 6,5	UA ₁ 12,6	UA ₂ > 10,9	UG ₁ 12,5	UG ₂ < 18,8	UT ₁ 8,4	UT ₂ < 27	dinucleotit RT (phút)
	C ^a	CU ₁ 5,6	< 6,6	CC ₁ 6,7	CC ₂ > 5,7	CA ₁ 8	CA ₂ > 7,4	CG ₁ 10,4	CG ₂ < 13,3	CT ₁ 5,6	CT ₂ < 6,1	dinucleotit RT (phút)
	A ^a	AU ₁ 3,5	< 3,6	AC ₁ 3,6	AC ₂ = 3,6	AA ₁ 4,2	AA ₂ > 4,1	AG ₁ 7,6	AG ₂ < 8,5	AT ₁ 3,5	AT ₂ < 3,6	dinucleotit RT (phút)
	G ^b	GU ₁ 7,6	< 8,1	GC ₁ 7,2	GC ₂ = 7,2	GA ₁ 9,7	GA ₂ > 8,9	GG ₁ 14,2	GG ₂ > 11,3	GT ₁ 7,4	GT ₂ < 7,5	dinucleotit RT (phút)
	T	TU ₁ 9,7	< 23,9	TC ₁ 8,9	TC ₂ > 5,6	TA ₁ 13,2	TA ₂ > 11,4	TG ₁ 13,2	TG ₂ < 20,0	TT ₁ 9	TT ₂ < 24	dinucleotit RT (phút)
^a bazơ của axit nucleic (nucleobase) không bảo vệ ^b nhóm guanin amino được bảo vệ bởi nhóm isobutryl ^c nhóm xytosin amino được bảo vệ bởi: (1) nhóm axetyl để ghép với U, C, A và G, (2) nhóm benzoyl để ghép với T ^d nhóm adenin amino được bảo vệ bởi nhóm benzoyl												

Điều kiện HPLC phân tích đối với profin của PMO dinucleotit gần như tinh khiết về mặt hóa học lập thể trong Bảng 2 được nêu dưới đây:

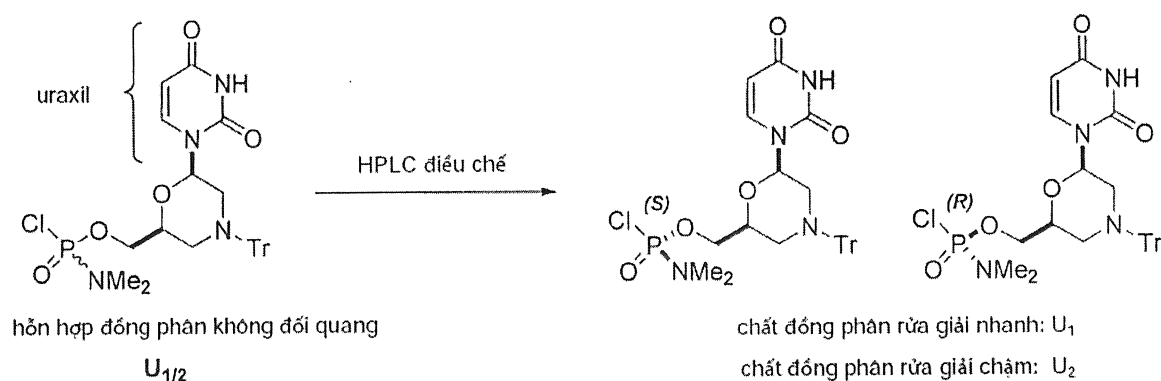
Cột HPLC	Chiralpak IC 4,6 x 250 mm 5 μ m
Nhiệt độ	30°C
Lưu lượng	1,0 mL/phút
Pha động	10% n-heptan, 80% EtOAc và 10% MeOH-EtOH 1:1 với 0,1% dietylamin
Gradient	Đẳng dòng
Thời gian chạy	30 phút
Thể tích phun	1-2 μ L (0,2 mg/ml, diclometan)
Máy dò	UV 260 nm

Ví dụ thực hiện sáng chế

III. Các ví dụ về sự phân tách đồng phân không đối quang của các monome hoạt tính

Các ví dụ sau thể hiện sự phân tách đồng phân không đối quang của các monome hoạt tính theo một số phương án nhất định nêu ở đây.

A. Monome U



Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome U hoạt tính:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5 μ	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1 mL/phút	
Pha động	Etyl axetat	
Gradient	Đẳng dòng	
Thời gian chạy	15 phút	
Thể tích phun	10 μ L (5mg/ml, etyl axetat)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	U ₁	5 phút
	U ₂	7,5 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome U hoạt tính:

Chiralpak IC, 21 x 250mm, 5 μ ; cột rửa giải ở 11 ml/phút với etyl axetat, nhiệt độ trong phòng, máy dò 260nm.

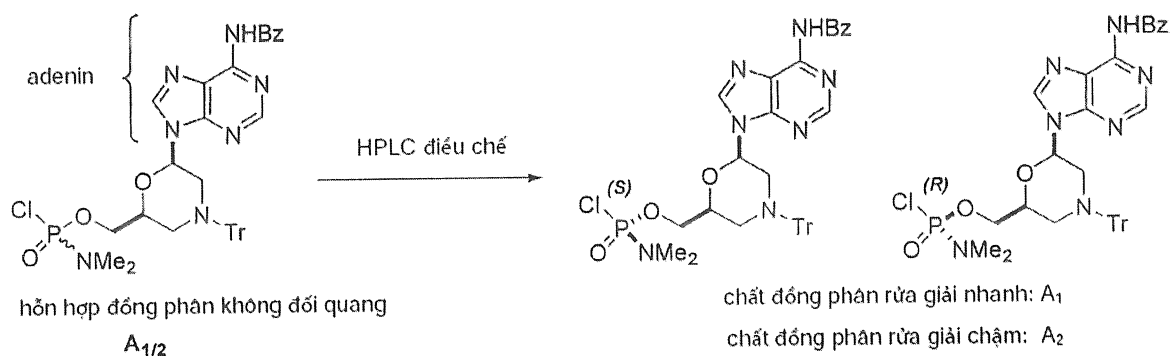
[Số liệu ¹H-NMR đối với U₁]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,18 (br, 1H), 7,45 (m, 6H), 7,15-7,32 (m, 10H), 6,12 (dd, 1H, J= 2,0 & 9,6 Hz), 5,62 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,11 (m, 2H), 3,39 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 11 Hz), 2,65 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,49 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,39 (t, 1H, J= 11 Hz)

[Số liệu ¹H-NMR đối với U₂]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,07 (br, 1H), 7,44 (m, 6H), 7,14-7,34 (m, 10 H), 6,12 (dd, 1H, J= 2 & 9 Hz), 5,61 (d, 1H, 8,0 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,39 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,66 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,46 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,38 (t, 1H, J= 11 Hz),

B. Monome A



Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome A hoạt tính:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5u	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1 mL/phút	
Pha động	Etyl axetat	
Gradient	Đẳng dòng	
Thời gian chạy	15 phút	
Thể tích phun	10 μ L (5mg/ml, etyl axetat)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	A_1	8,1 phút
	A_2	11,7 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome A hoạt tính:

Chiralpak IC, 21 x 250mm, 5u; rửa giải bằng 100% etyl axetat ở 15 ml/phút, nhiệt độ trong phòng, máy dò uv 260nm.

[Số liệu $^1\text{H-NMR}$ đối với A_1]

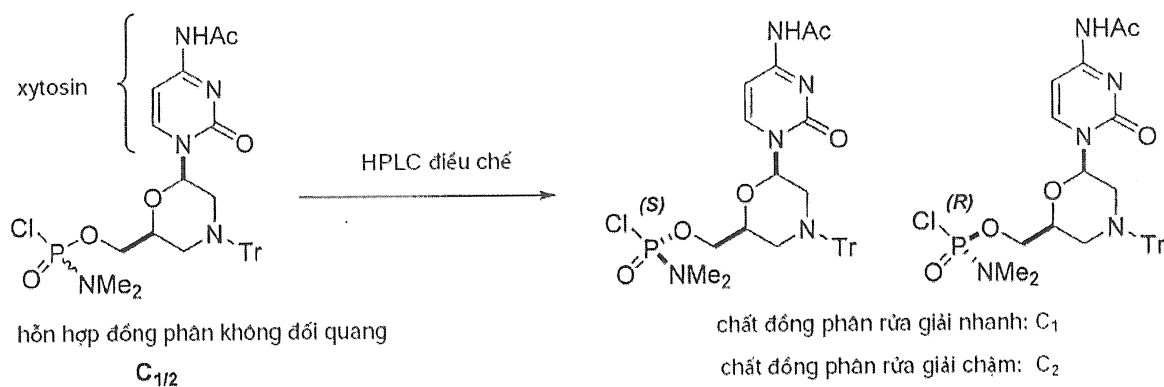
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9,01 (br, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,00 (m, 3H), 7,58 (m, 1H), 7,4-7,6 (m, 8 H), 7,2-7,4 (m, 10H), 6,42 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 4,51 (m, 1H), 4,12 (m, 3H), 3,54 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 3,25 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 2,62 (s, 3H), 2,59 (s, 3H), 1,81 (t,

1H, J= 11 Hz), 1,62 (t, 1H, J= 11 Hz)

[Số liệu ^1H -NMR đối với A₂]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,04 (br, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,00 (m, 3H), 7,56 (m, 1H), 7,4-7,6 (m, 8H), 7,2-7,4 (m, 10H), 6,41 (d, 1H, J= 8,4 Hz), 4,51 (m, 1H), 4,12 (m, 3H), 3,54 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,25 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,64 (s, 3H), 2,61 (s, 3H), 1,82 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,63 (t, 1H, J= 11 Hz)

C. Monome C



Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome C hoạt tính:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5 μ	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1,0 mL/phút	
Pha động	90% etyl axetat 10% n-heptan	
Gradien	Đẳng dòng	
Thời gian chạy	12 phút	
Thể tích phun	10 μL (5mg/ml, diclometan)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	C ₁	6,0 phút
	C ₂	6,2 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome C hoạt tính:

Chiralpak IC rửa giải ở 15 ml/phút với 75% etyl axetat và 25% n-heptan. Nhiệt độ trong phòng và máy dò uv 260nm.

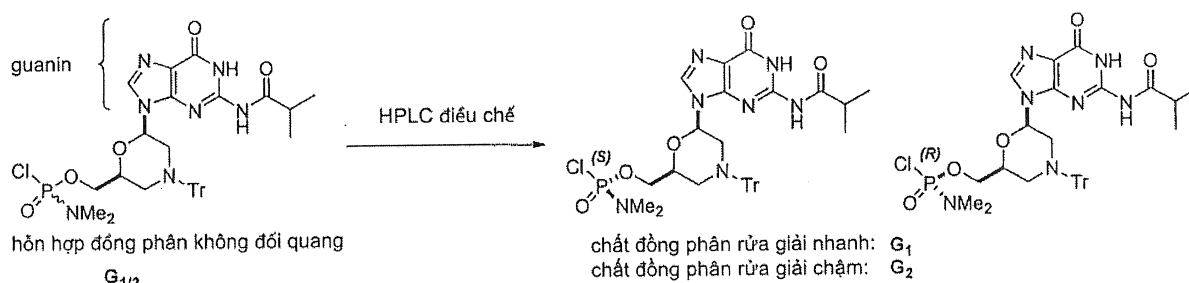
[Số liệu $^1\text{H-NMR}$ đối với C_1]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,66 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,43 (m, 6H), 7,33 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,15-7,32 (m, 9H), 6,18 (dd, 1H, $J = 2,2$ & 9,2 Hz), 4,42 (m, 1H), 4,08-4,16 (m, 2H), 3,54 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 3,14 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 2,64 (s, 3H), 2,60 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 1,51 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,25 (m, 1H).

[Số liệu $^1\text{H-NMR}$ đối với C_2]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,64 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,43 (m, 6H), 7,32 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,15-7,32 (m, 9H), 6,19 (dd, 1H, $J = 2,1$ & 9,2 Hz), 4,41 (m, 1H), 4,06-4,15 (m, 2H), 3,54 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 3,15 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 2,64 (s, 3H), 2,61 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 1,49 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,25 (m, 1H)

D. Monome G (guanin bảo vệ một lần)



Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome G hoạt tính:

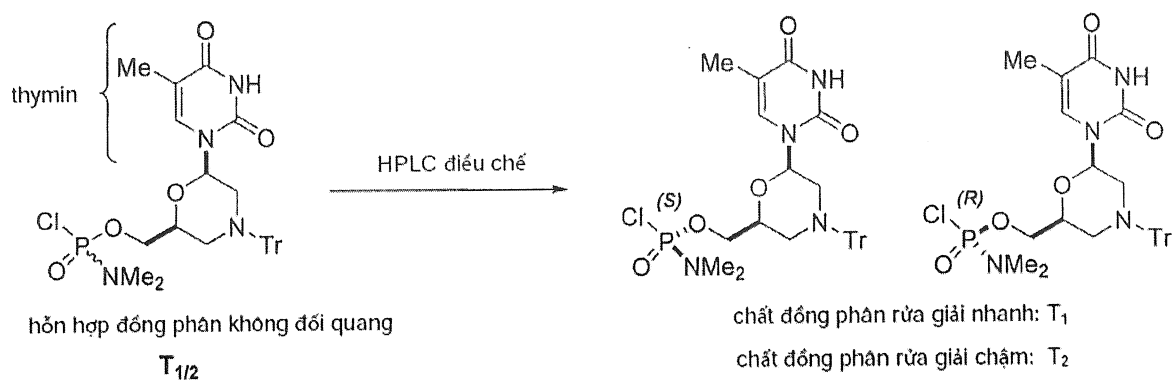
Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5 μ
Nhiệt độ	35°C
Lưu lượng	1,0 mL/phút
Pha động	etyl axetat
Gradient	Đẳng dòng
Thời gian chạy	30 phút

Thể tích phun	10 μ L (5mg/ml, etyl axetat)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	G ₁	17,8 phút
	G ₂	22,3 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome G hoạt tính:

Chiralpak IC rửa giải ở 15 ml/phút với 100% etyl axetat. Nhiệt độ trong phòng và máy dò uv 260nm.

E. Monome T



Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome T hoạt tính:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5 μ
Nhiệt độ	35°C
Lưu lượng	1 mL/phút
Pha động	Etyl axetat
Gradien	Đẳng dòng
Thời gian chạy	10 phút
Thể tích phun	10 μ L (5mg/ml, metylen clorua)
Máy dò	260 nm

Thời gian lưu	T ₁	4,5 phút
	T ₂	7,0 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome T hoạt tính:

Chiralpak IC, 50 x 500mm, 20u. Cột rửa giải ở 60 ml/phút với etyl axetat, nhiệt độ trong phòng, máy dò 260nm. Thời gian lưu là 25 và 40 phút.

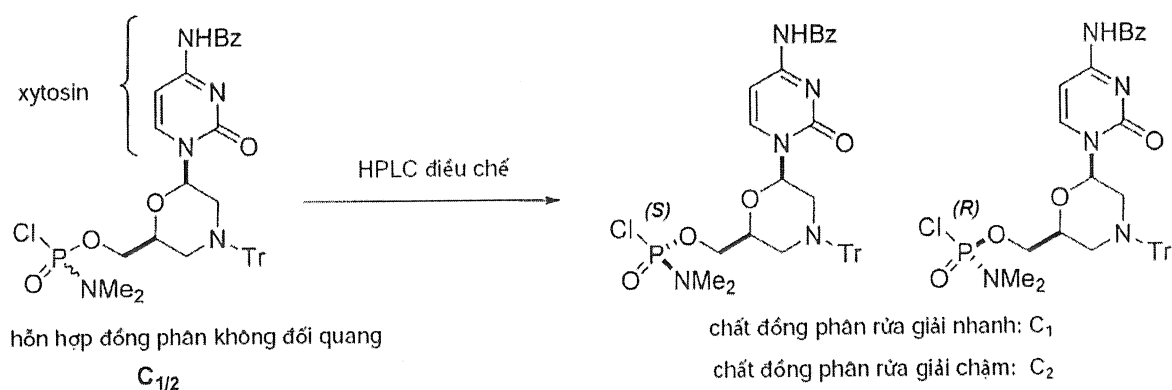
[Số liệu ¹H-NMR đối với T1]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,4-7,5 (m, 5H), 7,26-7,33 (m, 6H), 7,16-7,22 (m, 3H), 7,04 (d, 1H, J= 1 Hz), 6,12 (dd, 1H, J= 2 & 10 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,12 (m, 2H), 3,37 (d, 1H, J= 12 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,66 (s, 3H), 2,63 (s, 3H), 1,83 (d, 1H, J= 1 Hz), 1,49 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,41 (t, 1H, J= 11 Hz))

[Số liệu ¹H-NMR đối với T2]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,4-7,5 (m, 6H), 7,24-7,35 (m, 6H), 7,14-7,22 (m, 3H), 7,03 (s, 1H), 6,12 (dd, 1H, J= 2 & 10 Hz), 4,39 (m, 1H), 4,09 (m, 2H), 3,37 (d, 1H, J= 11 Hz), 3,15 (d, 1H, J= 11 Hz), 2,66 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 1,82 (s, 3H), 1,48 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,40 (t, 1H, J= 11 Hz)

F. Monome C (NBz)



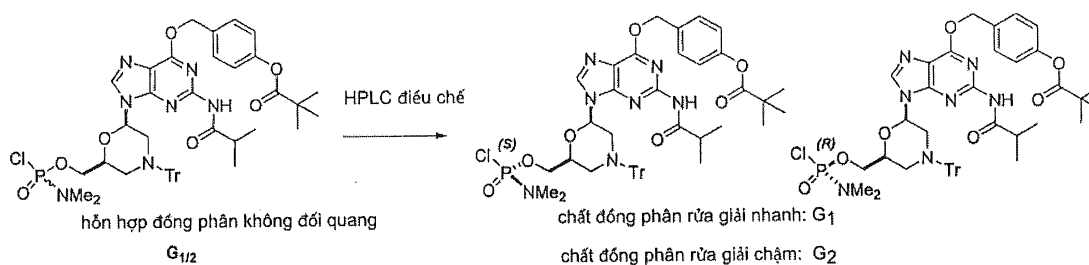
Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome C hoạt tính (NBz):

Cột HPLC	Chiralpak IB, 4,6 x 150mm, 5u	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1,0 mL/phút	
Pha động	100% axetonitril	
Gradient	Đẳng dòng	
Thời gian chạy	5 phút	
Thể tích phun	10 µL (5mg/ml, axetonitril)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	C ₁	3,4 phút
	C ₂	4,5 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome C hoạt tính (NBz):

Chiralpak IB, 20 x 250mm 5u, rửa giải ở 9 ml/phút với 100% axetonitril. Nhiệt độ trong phòng và máy dò uv 260nm. Thời gian lưu là 13 và 16 phút.

G. Monome G (guanin được bảo vệ gấp đôi)



Điều kiện HPLC phân tích đối với các monome G hoạt tính (guanin được bảo vệ gấp đôi):

Cột HPLC	Chiralpak IA, 4,6 x 250mm, 5u
Nhiệt độ	35°C
Lưu lượng	1,0 mL/phút

Pha động	70% etyl axetat / 30% metylen clorua	
Gradien	Đẳng dòng	
Thời gian chạy	8 phút	
Thể tích phun	10 μ L (5mg/ml, etyl axetat)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	G ₁	3,9 phút
	G ₂	4,3 phút

Điều kiện HPLC điều chế đối với các monome G hoạt tính (guanin được bảo vệ gấp đôi):

Chiralpak IA 50 x 500mm, rửa giải ở 60 ml/phút với 100% etyl axetat. Nhiệt độ trong phòng và máy dò uv 260nm. Thời gian lưu là 20 và 24 phút.

[Số liệu ^1H -NMR đối với G₁ (guanin được bảo vệ gấp đôi)]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (s, 2H), 7,50 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 7,4-7,5 (m, 6H), 7,26-7,32 (m, 6H), 7,16-7,22 (m, 3H), 7,02 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 6,24 (dd, 1H, $J = 2$ & 10 Hz), 5,61 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 5,56 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4,48 (m, 1H), 4,1 (m, 2H), 3,47 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 3,23 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 3,2 (m, 1H), 2,62 (s, 3H), 2,59 (s, 3H), 1,75 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,57 (t, 1H, $J = 12$ Hz), 1,33 (s, 9H), 1,33 (t, 6H, $J = 7$ Hz)

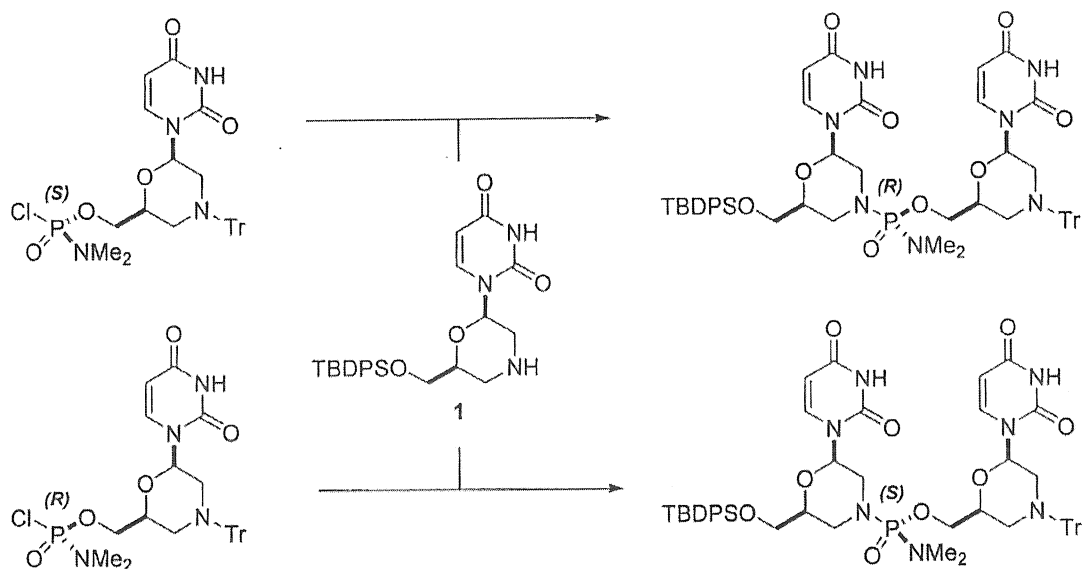
[Số liệu ^1H -NMR đối với G₂ (guanin được bảo vệ gấp đôi)]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,78 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,50 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 7,4-7,5 (m, 6H), 7,26-7,33 (m, 6H), 7,15-7,22 (m, 3H), 7,02 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 6,23 (dd, 1H, $J = 2$ & 10 Hz), 5,61 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 5,56 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 4,47 (m, 1H), 4,1 (m, 2H), 3,47 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 3,22 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 3,2 (m, 1H), 2,64 (s, 3H), 2,60 (s, 3H), 1,75 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,58 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,33 (s, 9H), 1,33 (t, 6H, $J = 7$ Hz)

IV. Các ví dụ về phản ứng ghép PMO đặc thù lập thể với các monome có hoạt tính tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang

Các ví dụ sau trình bày về việc sử dụng phản ứng ghép đặc thù lập thể để tạo ra các sản phẩm đồng nhất về mặt hóa học lập thể.

A. Các monome U hoạt tính (U_1 & U_2) + U-Morpholin-NH (1)



chất đồng phân rửa giải nhanh: U_1

chất đồng phân rửa giải chậm: U_2

chất đồng phân rửa giải nhanh: 2

chất đồng phân rửa giải chậm: 3

Hòa tan U_1 (11 mg, 0,018 mmol, 1 đương lượng, 99,0% de) trong axetonitril (0,11 ml) và trộn với diisopropyletylamin (8 μ L, 0,05 mmol, 2,5 đương lượng). Thêm U-morpholin-NH (hợp chất 1; 14 mg, 0,030 mmol, 1,6 đương lượng) và dùng khuấy âm để hỗ trợ cho việc hòa tan. Sau 0,5 giờ khuấy, lượng nhỏ hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng $CDCl_3$ và được phân tích bằng 1H NMR. Tất cả phần còn lại của hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng axetonitril (8 ml) để phân tích HPLC và giữ trong buồng lạnh. Xác định sự tạo thành chất đồng phân 2 đặc thù lập thể bằng cách phân tích HPLC (99,4% de). Phương pháp nêu trên cũng được dùng để ghép U_2 (95,6% de) để tạo ra chất đồng phân 3 đặc thù lập thể (96,0% de).

Điều kiện HPLC phân tích để ghép U/U:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5 μ	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1,0 mL/phút	
Pha động	80% metanol 20% axetonitril	
Gradient	Đẳng dòng	
Thời gian chạy	30 phút	
Thể tích phun	10 μ L (2mg/ml, axetonitril)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	U ₁	11,5 phút
	U ₂	21,5 phút
	2	12,0 phút
	3	22,1 phút

chất cho điện tử	monome U hoạt tính		Sản phẩm (UU dinucleotit)
U morpholin-NH (1)	U ₁ (99,0% de)	→	2 (99,4% de)
	U ₂ (95,6% de)	→	3 (96,0% de)

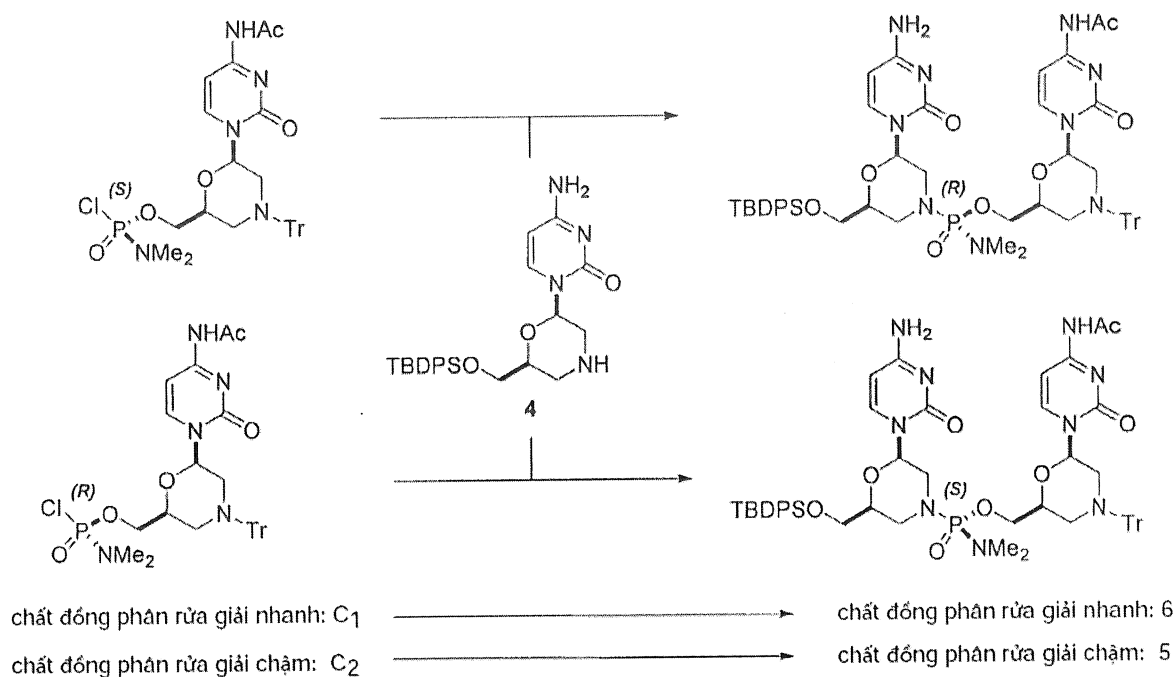
[Số liệu ¹H-NMR đối với 2]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,6 (m, 4H), 7,2-7,5 (m, 20H), 7,1-7,2 (m, 3H), 6,15 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,73 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,66 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 5,54 (d, 1H, J= 8,0 Hz), 4,40 (m, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,70 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,40 (m, 3H), 3,11 (d, 1H, J= 12 Hz), 2,78 (m, 1H), 2,56 (s, 3H; NMe), 2,54 (s, 3H; NMe), 2,48 (m, 1H), 1,47 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,35 (t, 1H, J= 11 Hz), 1,04 (s, 9H)

[Số liệu $^1\text{H-NMR}$ đối với 3]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,6 (m, 4H), 7,3-7,5 (m, 11H), 7,2-7,3 (m, 9H), 7,1 (m, 3H), 6,12 (dd, 1H, $J = 2,0$ & 9,6 Hz), 5,71 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 5,70 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 5,47 (dd, 1H, $J = 2,0$ & 10,4 Hz), 4,31 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,31 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 3,07 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 2,68 (m, 1H), 2,65 (s, 3H; NMe), 2,62 (s, 3H; NMe), 2,26 (m, 1H), 1,45 (t, 1H, $J = 12$ Hz), 1,29 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,04 (s, 9H)

B. Monome C hoạt tính (C_1 & C_2) + C-Morpholin-NH (4)



C_1 (20 mg, 0,031 mmol, 1 đương lượng, 93,5% de) được hòa tan/tạo huyền phù trong THF (0,40 ml) và được trộn với diisopropyletylamin (12 μL , 0,069 mmol, 2,3 đương lượng). Thêm morpholino-xytosin (hợp chất 4; 16 mg, 0,035 mmol, 1,1 đương lượng) hòa tan trong THF (0,20 mL). Sau 1,0-2,0 giờ khuấy, pha loãng lượng nhỏ hỗn hợp phản ứng bằng axetonitril và phân tích bằng LC/MS. Pha loãng lượng nhỏ (30-50 μL) hỗn hợp phản ứng bằng diclometan (0,6 ml) để phân tích HPLC. Xác định sự tạo thành chất đồng phân 6 đặc thù lập thể bằng cách phân tích HPLC (94,3% de). Hỗn hợp phản ứng được nạp trực tiếp lên cột silica gel và rửa giải bằng gradien pha động có 0-

15% metanol trong etyl axetat. Phương pháp nêu trên cũng được dùng để ghép C/C đối với C₂ (90,2% de) để tạo ra chất đồng phân 5 đặc thù lập thể (90,0% de).

Điều kiện HPLC phân tích để ghép C/C:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5u	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1,0 mL/phút	
Pha động	Dung môi A	n-heptan
	Dung môi B	1:1 etanol: metanol 0,1% diethylamin (DEA)
Gradient	Đẳng dòng	
	%A	%B
	50	50
Thời gian chạy	20 phút	
Thể tích phun	5 µL (3 mg/ml, diclometan)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	4	5,4 phút
	5	10,5 phút
	6	12,9 phút

chất cho điện tử	monome C hoạt tính		Sản phẩm (CC dinucleotit)
C morpholin-NH (4)	C ₁ (93,5% de)	→	6 (94,3% de)
	C ₂ (90,2% de)	→	5 (90,0% de)

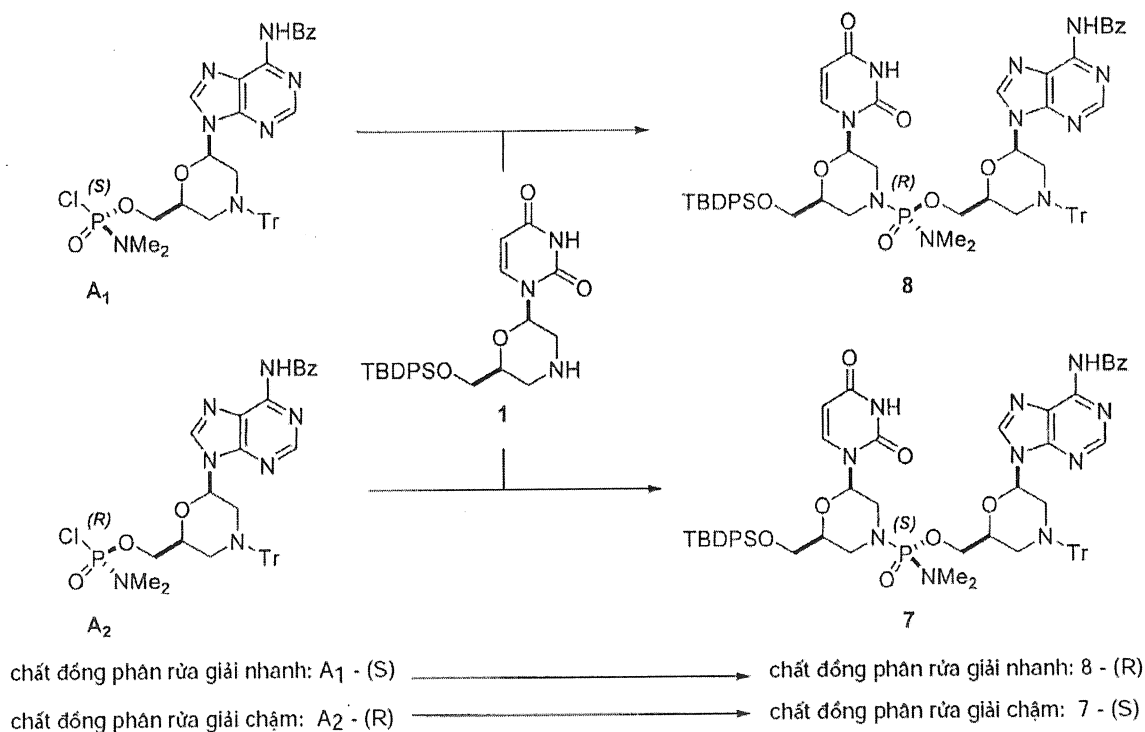
[Số liệu ¹H-NMR đối với 5]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,9 (br, 1H), 7,69 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,62 (m, 5H), 7,35-7,44 (m, 13H), 7,21-7,35 (m, 6H), 7,15 (m, 4H), 6,14 (br d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 5,58 (dd, 1H, $J = 2,4$ & $9,4$ Hz), 5,53 (br, 1H), 4,51 (dd, 1H, $J = 8,6$ & 10 Hz), 4,09 (m, 1H), 3,70-3,80 (m, 4H), 3,60 (dd, 1H, $J = 6,3$ & 10 Hz), 3,56 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 3,28 (m, 1H), 2,96 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 2,69 (s, 3H; NMe), 2,67 (s, 3H; NMe), 2,65 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,31 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,13 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 1,04 (s, 9H).

[Số liệu ^1H -NMR đối với 6]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,57 (br, 1H), 7,62-7,70 (m, 7H), 7,35-7,50 (m, 14H), 7,23-7,35 (m, 4H), 7,12 (m, 4H), 6,31 (m, 1H), 5,79 (m, 1H), 5,70 (m, 1H), 4,61 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,80-3,90 (m, 2H), 3,72 (m, 2H), 3,58 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,09 (m, 1H), 2,75 (m, 1H), 2,58 (s, 3H; NMe), 2,55 (s, 3H; NMe), 2,53 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 1,47 (t, 1H, $J = 10$ Hz), 1,22 (t, 1H, $J = 10$ Hz), 1,06 (s, 9H).

C. Monome A hoạt tính (A_1 & A_2) + U-Morpholin-NH (1)



A_1 (5,9 mg, 0,008 mmol) được tạo huyền phù trong axetonitril (118 μL). Thêm

diisopropyletylamin (5 μ L, 0,03 mmol), sau đó thêm morpholino-uraxil (hợp chất 1; 4,6 mg, 0,01 mmol). Khuấy âm được dùng trong 1 phút và khuấy hỗn hợp đồng nhất thu được ở nhiệt độ môi trường. Sau khi khuấy qua đêm, pha loãng hỗn hợp (bột nhão đặc màu trắng) bằng hỗn hợp axetonitril (5,0 ml) và metanol (0,30 ml) để tạo ra dung dịch trong đồng nhất. Lượng nhỏ được phân tích trực tiếp bằng HPLC mà không cần pha loãng thêm.

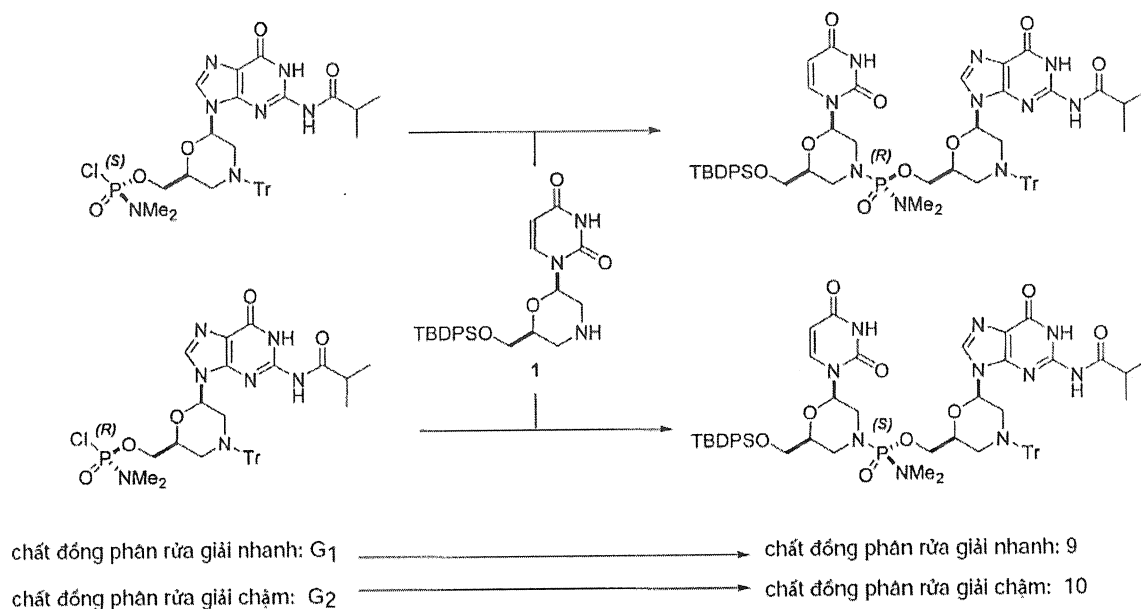
A₂ (F2; 5,0 mg, 0,007 mmol) được tạo huyền phù trong axetonitril (100 μ l). Thêm diisopropyletylamin (4 μ l, 0,02 mmol), sau đó thêm morpholino-uraxil (4,1 mg, 0,009 mmol). Khuấy âm được dùng trong 1 phút và khuấy huyền phù đặc thu được ở nhiệt độ môi trường. Sau khi khuấy qua đêm, thêm axetonitril (5,0 ml) vào và khuấy âm được dùng để tạo ra dung dịch trong đồng nhất. Lượng nhỏ được phân tích trực tiếp bằng HPLC mà không cần pha loãng thêm.

Điều kiện HPLC phân tích để ghép U/A:

Cột HPLC	Chiralpak IC, 4,6 x 250mm, 5 μ	
Nhiệt độ	35°C	
Lưu lượng	1 mL/phút	
Pha động	Dung môi A	Etyl axetat
	Dung môi B	1:1 etanol/metanol với 0,1% dietylamin
Gradient	Đẳng dòng: 98% dung môi A, 2% dung môi B	
Thời gian chạy	30 phút	
Thể tích phun	5 μ L (1mg/ml, axetonitril-metanol)	
Máy dò	260 nm	
Thời gian lưu	7 (chất đồng phân S)	21,7 phút
	8 (chất đồng phân R)	24,9 phút

chất cho điện tử	Monome A hoạt tính		Sản phẩm (UA dinucleotit)
U morpholin-NH (1)	A ₁ (97,8% de)	→	8 (chất đồng phân R, 96,2% de)
	A ₂ (98,4% de)	→	7 (chất đồng phân S, 98,3% de)

D. Monome G hoạt tính (G₁ & G₂) + U-Morpholin-NH (1)



G₁ (6,5 mg, 0,009 mmol, 1 đương lượng, 99,9% de) được hòa tan/tạo huyền phù trong THF (0,13 ml) và được trộn với diisopropyletylamin (3,6 µL, 0,02 mmol, 2,2 đương lượng). Morpholino-uraxil (hợp chất 1; 4,7 mg, 0,010 mmol, 1,1 đương lượng) hòa tan trong THF (0,07 mL) được thêm vào. Sau 1,0-2,0 giờ khuấy, lượng nhỏ hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng axetonitril và được phân tích bằng LC/MS. Lượng nhỏ (100 µL) hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan (0,4 ml) để phân tích HPLC. Xác định sự tạo thành chất đồng phân 9 đặc thù lập thể bằng cách phân tích HPLC (99,9% de).

Điều kiện HPLC phân tích để ghép U/G:

Cột HPLC	Chiralpak IA, 4,6 x 250mm, 5u		
Nhiệt độ	35°C		
Lưu lượng	1,0 mL/phút		
Pha động	Dung môi A	n-heptan	
	Dung môi B	Etyl axetat	
	Dung môi C	1:1 etanol: metanol 0,1% diethylamin (DEA)	
Gradient	Đẳng dòng		
	%A	%B	%C
	55	40	5
Thời gian chạy	30 phút		
Thể tích phun	5 µL (2 mg/ml, diclometan)		
Máy dò	260 nm		
Thời gian lưu	1	8,4 phút	
	9	14,0 phút	
	10	16,3 phút	

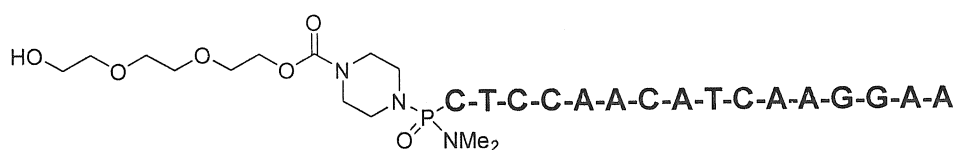
chất cho điện tử	monome G hoạt tính		Sản phẩm (UG dinucleotit)
U morpholin-NH (1)	G ₁ (99,9% de)	→	9 (99,9% de)

Các hợp chất gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang như nêu trên có thể được sử dụng để điều chế các oligonucleotit tinh khiết về mặt hóa học lập thể và các hợp chất khác. Ví dụ về các oligonucleotit tiềm năng được thể hiện, ví dụ, trong tài liệu Summerton, J (1999). "Morpholino Antisense Oligomers: The Case for an RNase-H Independent Structural Type.". *Biochimica et Biophysica Acta* 1489 (1): 141–58; và trong tài liệu Summerton, J; Weller D. (1997). "Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties". *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 7 (3): 187–95. Cả hai tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

V. Ví dụ về quy trình tổng hợp 16-me PMO đặc thù lập thể và sự khác biệt của các chất đồng phân lập thể bằng thử nghiệm lý sinh

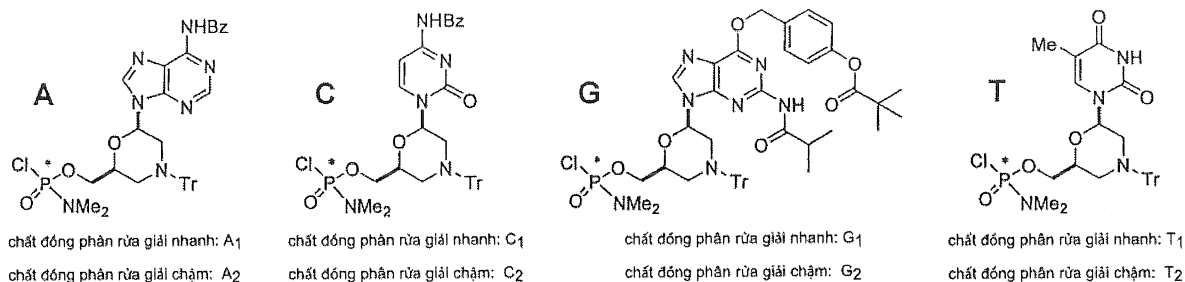
Ví dụ này trình bày quy trình tổng hợp mà hướng đích là cặp 16-me PMO tinh khiết lập thể thông qua ghép đặc thù lập thể sử dụng các monome hoạt tính. Các PMO này có các ma trận hóa học lập thể trái ngược nhau về liên kết phospho của chúng.

Trình tự đích:



(SEQ ID NO: 2)

Monome hoạt tính tinh khiết lập thể (các đơn thể):



PMO đích	Monome hoạt tính tinh khiết lập thể sử dụng để ghép
Chất đồng phân lập thể 1	A ₂ , C ₂ , G ₁ và T ₁
Chất đồng phân lập thể 2	A ₁ , C ₁ , G ₂ và T ₂

Sơ đồ tổng hợp 16-me PMO đặc thù lập thể và sự khác biệt của các chất đồng phân lập thể bằng thử nghiệm lý sinh được thể hiện trên FIG. 6. Các chất đồng phân lập thể 16-me PMO 1 và chất đồng phân lập thể 2 được tạo ra thủ công bằng cách tổng hợp pha rắn trên nhựa aminomethylpolystyren-disulfua (tốc độ nạp ~300 μmol/g, xem công bố đơn Mỹ số 20090131624A1, được kết hợp ở đây để tham khảo) ở phạm vi 50 mg (trọng lượng nhựa ban đầu).

Dung dịch gốc để tổng hợp pha rắn:

Khử trityl hóa	4-xyanopyridin trifloaxetat (CYTFA) 2% (trọng lượng/thể tích) và 0,9% etanol (thể tích/thể tích) trong 20% trifloetanol/DCM (thể tích/thể tích).
Trung hoà	5% diisopropyletylamin (thể tích/thể tích) trong 25% isopropanol/DCM (thể tích/thể tích).
Ghép	Chuẩn bị 55 mM dung dịch mới trong NEM-DMI* đối với mỗi monome hoạt tính tinh khiết lập thể (A ₂ , C ₂ , G ₁ và T ₁ đối với chất đồng phân lập thể 1; A ₁ , C ₁ , G ₂ và T ₂ đối với chất đồng phân lập thể 2) * 0,11M N-etylmorpholin trong 1,3-dimetylimidazolidinon (DMI)

Chu kỳ làm việc của mỗi lần ghép PMO:

Bước	Thể tích (ml)	Thời gian (phút)
DCM	1-2	2-5
Khử trityl hoá	1-2	5
Khử trityl hoá	1-2	5
Khử trityl hoá	1-2	5
Khử trityl hoá	1-2	5
Khử trityl hoá	1-2	5
DCM	1-2	2-5
Trung hoà	1-2	2-5
Trung hoà	1-2	2-5
Trung hoà	1-2	2-5
Trung hoà	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
Ghép	1	>180*
DCM	1-2	2-5
Trung hoà	1-2	2-5
Trung hoà	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5
DCM	1-2	2-5

* 40°C trong 3 giờ hoặc nhiệt độ trong phòng trong 12 giờ.

Giải phóng khỏi nhựa và khử bảo vệ:

Thêm 28% dung dịch nước amoniac/etanol (~5 ml) theo tỷ lệ 1:3 (thể tích/thể tích) vào nhựa liên kết 16-me (sau khi khử trityl hoá). Làm kín hỗn hợp và gia nhiệt ở 45°C trong 20 giờ. Sau khi làm mát đến nhiệt độ trong phòng, lọc hỗn hợp và rửa bằng metanol. Cô đặc phần lọc và lọc tuần hoàn có pha loãng bằng 15 mM đệm triethylamoni (TEAA) độ pH 7,0. Thiết bị được sử dụng là Amicon Stirred Cell (50 mL) có màng Ultracel 1kDa UF. Các mẫu được lọc tuần hoàn có pha loãng bằng cách pha loãng/cô đặc cho đến khi dung môi gốc giảm còn 1% nồng độ gốc (xấp xỉ 5 chu kỳ) và sau đó đưa vào tình chế HPLC điều chế pha đảo.

Phương pháp HPLC điều chế pha đảo để tinh chế PMO:

Cột HPLC	Cột XBridge Prep C8 OBD, 9 x 150 mm, 5µm		
Nhiệt độ cột	nhiệt độ môi trường		
Lưu lượng	30,0 ml/phút		
Gradient	Thời gian (phút)	%A	%B
	Ban đầu	85	15
	18	80	20
	20	0	100
Pha động	Dung môi A: 15mM đệm triethylamoni axetat (TEAA), độ pH7 + 10% MeOH Dung môi B: axetonitril + 10% MeOH		
Dung dịch pha loãng	15 mM đệm TEAA		
Thời gian chạy	20 phút		
Máy dò	UV 260 nm		
Thời gian lưu	Chất đồng phân lập thể 1	13,98 phút	
	Chất đồng phân lập thể 2	14,03 phút	

Phương pháp LC/MS để đánh giá chất lượng PMO:

Cột HPLC	Waters BEH C18 Oligo 2,1 x 50mm 130 Angstrom 1,7um		
Nhiệt độ cột	45°C		
Lưu lượng	0,3 mL/phút		
Gradient	Thời gian (phút)	%A	%B
	Ban đầu	95	5
	2	95	5
	20	50	50
	24	50	50
	24,1	95	5
	30	95	5
Pha động	Dung môi A: 50 mM amoni axetat Dung môi B: Axetonitril/Metanol 1/1 thể tích/thể tích với 50 mM amoni axetat		
Thời gian chạy	30 phút		
Thể tích phun	25 µL chất pha loãng: nước hoặc 10 mM triethylamin axetat		
Máy dò	UV 260 nm		
Chế độ MS/Ion hoá	Synapt G2/Phương pháp phun điện tử dương		
Điện áp hình nón/Nguồn	30 V/4 V/2,8 kV		
Nhiệt độ nguồn/ Năng lượng va chạm/Chức năng MS/Phân tích	100°C/ 4 eV (năng lượng thấp) 40-70 eV (năng lượng cao/phương pháp MS ^E /Tháo cuộn và khử đồng vị sử dụng phần mềm Waters MSe Viewer		
Thời gian lưu	Chất đồng phân lập thể 1	10,83 phút	
	Chất đồng phân lập thể 2	10,86 phút	

Nguyên liệu và điều kiện của phép đo nhiệt độ nóng chảy (Melting Temperature - T_m)

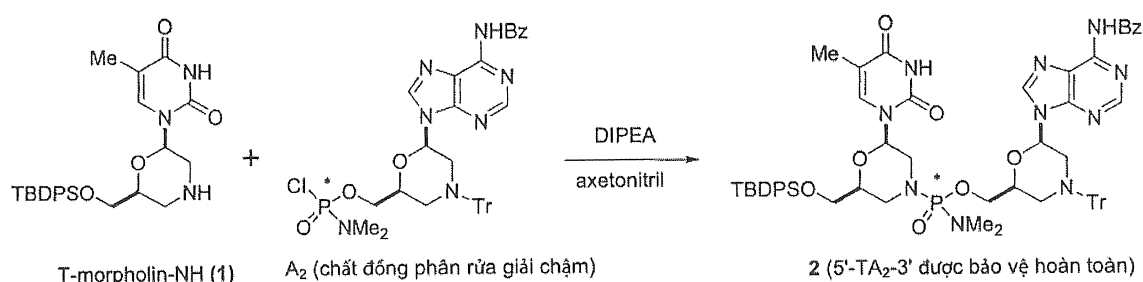
ARN bổ sung (16-me)	5'-UUCCUUGAUGUUGGAG-3' (SEQ ID NO. 1) (Kỹ thuật ADN kết hợp IDT)
Đệm pha loãng	10 mM natri phosphat, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, độ pH 7,0 (điều chỉnh bằng axit phosphoric)
Thiết bị làm nóng chảy bằng nhiệt	Quang phổ kế Shimadzu 2700 UV-Vis được trang bị mô đun nhiệt độ Shimadzu S-1700
Máy cô đặc ly tâm chân không	Labconco Centrivap Concentrator Model 7810015
Dung dịch gốc	8 μ M trong 250 μ L đệm mỗi mẫu và ARN bổ sung được chuẩn bị sử dụng đệm pha loãng từ các mẫu đã cô đặc và làm khô bằng cách ly tâm chân không
Quy trình	- Sau đó, mỗi mẫu được trộn với thể tích tương đương 8 μM ARN bổ sung - Hỗn hợp được gia nhiệt đến 95°C và sau đó được làm mát xuống 25°C để nung trước khi đo T_m. - Tiến hành phân tích T_m (UV 260 nm) ở nhiệt độ từ 25°C đến 105°C ở 0,5°C/phút (với nhiệt độ trở lại điều kiện ban đầu sau mỗi lần chạy chương trình) và sau đó lặp lại trong cùng điều kiện. - Sử dụng phần mềm phân tích T_m (Shimadzu) để tính T_m sử dụng hàm “trung trình”.

Tóm tắt đặc trưng nhiệt nóng chảy của phức của các PMO riêng biệt về mặt hóa học lập thể có các ARN bổ sung:

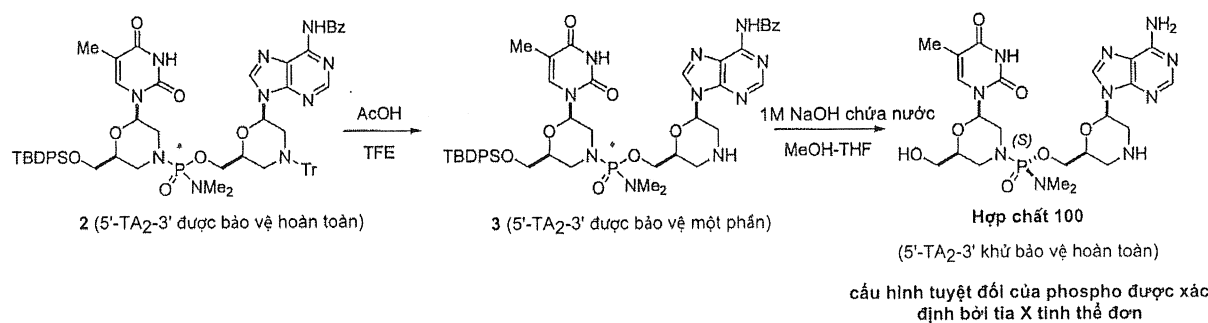
	Độ tinh khiết LC/MS (% diện tích)	T _m (°C)
Chất đồng phân lập thể 1	97,6	62,8
Chất đồng phân lập thể 2	94,2	57,2

Nhiệt độ nóng chảy của các chất đồng phân lập thể 1 và 2 được thể hiện trên FIG. 7. Dựa vào nhiệt độ nóng chảy khác nhau, có thể kết luận được lượng riêng rẽ các chất đồng phân lập thể gần như tinh khiết được tạo ra.

VI. Ví dụ về quy trình tổng hợp đặc thù lập thể và sự phân chia hóa học lập thể tuyệt đối của PMO dinucleotit tinh khiết lập thể **Hợp chất 100** (5'-TA₂-3')



Monome A hoạt tính rửa giải chậm (A₂; 200 mg, 0,277 mmol, 1 đương lượng) được hòa tan trong hỗn hợp chứa axetonitril (2,0 ml) và DIPEA (0,12 ml, 0,69 mmol, 2,5 đương lượng). Sau đó, thêm T-morpholin-NH (hợp chất 1; 146 mg, 0,305 mmol, 1,1 đương lượng) và dùng khuấy âm cho huyền phù thu được trong vài phút cho đến khi thu được dung dịch trong. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Khi quan sát bằng LC/MS thấy phản ứng đã hoàn thành, hỗn hợp được cô đặc và được đưa vào sắc ký cột (3% metanol trong DCM, Biotage SnapUltra 10g SiO₂). Gom các phân đoạn sản phẩm sạch và cô đặc trong chân không để tạo ra 5'-TA-3' dinucleotit **2** tinh khiết lập thể được bảo vệ hoàn toàn dưới dạng chất rắn màu trắng (240 mg, 0,206 mmol, hiệu suất 74%).



Trong bình phản ứng thể tích 25 ml, thêm 2,2,2-trifloetanol (TFE; 4,0 ml) và axit

axetic (1,0 ml) vào dinucleotit **2** được bảo vệ hoàn toàn (500 mg, 0,429 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng và quan sát bằng LC/MS. Sau 30 phút, làm lạnh đột ngột phản ứng bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa và DCM. Hai lớp được tách và lớp nước được chiết lại. Gom tất cả các lớp hữu cơ, rửa bằng nước muối nửa bão hòa, làm khô bằng Na₂SO₄ khan, lọc và cô đặc để tạo ra sản phẩm thô dưới dạng bột màu trắng. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột (20% MeOH trong axeton, hộp Biotage Snap Ultra 25g SiO₂) để tạo ra dinucleotit **3** được bảo vệ một phần dưới dạng chất rắn trong suốt (300 mg, 0,325 mmol, hiệu suất 76%).

Dinucleotit **3** được bảo vệ một phần (250 mg, 0,271 mmol) được hòa tan trong hỗn hợp gồm metanol (12,5 ml) và THF (12,5 mL) và được xử lý bằng NaOH 1M (10,8 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 22 giờ (quan sát quá trình này bằng LC/MS), hỗn hợp được trung hòa bằng HCl 1M (10,8 mL) để điều chỉnh độ pH bằng 8 và sau đó cô đặc trong chân không đến khô. Hòa tan phần cặn trong nước (5 mL) và rửa bằng EtOAc (5 mL). Cô đặc lớp nước trong chân không đến khô để tạo ra sản phẩm thô dưới dạng chất rắn màu trắng (480 mg). Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký theo loại trừ kích thước (Sephadex® LH-20, MeOH/nước theo tỷ lệ 4:1) để tạo ra dinucleotit khử bảo vệ hoàn toàn **Hợp chất 100** dưới dạng chất rắn màu trắng (137 mg, 0,236 mmol, hiệu suất 87%).

Một giọt dung dịch nước chứa **Hợp chất 100** (200 mg/ml) được bao kín bằng nước tinh khiết trong lọ trong một ngày để phát triển thành tinh thể đơn. Cấu trúc tia X của tinh thể đơn xác định cấu hình tuyệt đối của liên kết phospho là *S*. Cấu trúc tia X được thể hiện trên sơ đồ ORTEP trên FIG. 8. Sơ đồ ORTEP gồm các đoạn riêng rẽ được thể hiện trên FIG. 9A và FIG. 9B. Thu được số liệu tia X như nêu dưới đây.

Thu thập số liệu

Tinh thể đơn của **Hợp chất 100** (C₂₂H₃₃N₁₀O₇P) được đặt trên sợi thủy tinh. Tất cả các phép đo được thực hiện trên nhiễu xạ kế sử dụng bức xạ Cu-K α graphit monocrom hóa.

Hằng số ô và ma trận định hướng để thu thập số liệu, thu được từ phương pháp sàng lọc bình phương tối thiểu sử dụng góc lệch của 36473 phản xạ định tâm nằm trong khoảng $7,75 < 2\theta < 147,10^\circ$ tương ứng với ô đơn nghiêng tâm C có kích thước:

$$a = 33,3523(2) \text{ \AA}$$

$$b = 13,80020(11) \text{ \AA} \quad \beta = 96,8075(6)^\circ$$

$$c = 14,19956(10) \text{ \AA}$$

$$V = 6489,53(8) \text{ \AA}^3$$

Đối với $Z = 4$ và F.W. = 580,54, mật độ theo tính toán là $0,594 \text{ g/cm}^3$. Dựa vào điều kiện phản xạ:

$$hkl: h+k = 2n$$

ngiên cứu điều kiện đóng gói, phân tích thống kê sự phân bố cường độ, và giải mã và sàng lọc cấu trúc thành công, nhóm không gian được xác định là:

$$C2 \text{ (#5)}$$

Số liệu thu được ở nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sử dụng kỹ thuật quét ω - 2θ đến giá trị 2θ tối đa là $147,7^\circ$. Quét omega một số phản xạ cường độ khác nhau, trước khi thu thập số liệu, có chiều rộng trung bình ở nửa chiều cao tại $0,00^\circ$ với góc hứng bằng $6,0^\circ$. Tiến hành quét $(0,00 + 0,00 \tan \theta)^\circ$ ở tốc độ $0,0^\circ/\text{phút}$ (theo ω).

Rút gọn số liệu

Thu được 50795 phản xạ, trong đó 12008 phản xạ là đơn nhất ($R_{\text{int}} = 0,0453$). Số liệu được thu gom và xử lý bằng cách sử dụng CrysAlisPro (Rigaku Oxford Diffraction). (CrysAlisPro: Phần mềm thu thập và xử lý số liệu, Rigaku Corporation (2015). Tokyo 196-8666, Japan). Không áp dụng hiệu chỉnh suy giảm.

Hệ số hấp thụ tuyến tính, μ , đối với bức xạ Cu-K α là $6,011 \text{ cm}^{-1}$. Áp dụng hiệu chỉnh hấp thụ thực nghiệm dẫn đến hệ số truyền nằm trong khoảng từ 0,341 đến 1,000.

Số liệu được hiệu chỉnh về hiệu quả Lorentz và phân cực hóa.

Giải mã cấu trúc và sàng lọc

Cấu trúc được giải mã bằng các phương pháp trực tiếp (*SHELXT Version 2014/5*: Sheldrick, G. M. (2014). *Acta Cryst.* A70, C1437) và được phát triển bằng cách sử dụng kỹ thuật Fourier. Các nguyên tử không phải hydro được lọc không đẳng hướng. Các nguyên tử hydro được lọc sử dụng mô hình đầy. Chu kỳ cuối của quy trình sàng lọc bình phương tối thiểu toàn bộ ma trận (sử dụng hàm bình phương tối thiểu được tối giản hóa: (*SHELXL Version 2014/7*); $\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2$ trong đó w = trọng lượng bình phương tối thiểu) trên F^2 được dựa trên 12008 phản xạ quan sát thấy và 849 thông số biến đổi và đồng quy (sự thay đổi thông số lớn nhất là 0,00 lần) với các hệ số thỏa thuận không trọng lượng và có trọng lượng là:

$$R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o| = 0,0522$$

$$wR2 = [\sum (w (F_o^2 - F_c^2)^2) / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2} = 0,1632$$

Sự phù hợp là 1,45. Sự phù hợp được xác định là: $[\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (N_o - N_v)]^{1/2}$, trong đó: N_o = số lần quan sát và N_v = số biến.

Đơn vị trọng lượng được sử dụng. Các đỉnh cực đại và cực tiểu trên đồ thị vi sai Fourier cuối cùng lần lượt tương ứng với 1,79 và -0,69 e-/Å³. Thông số Flack cuối cùng là 0,029(7), cho thấy cấu trúc này là cặp đôi nghịch đảo. (Parsons, S. and Flack, H. (2004), *Acta Cryst.* A60, s61; Flack, H.D. and Bernardinelli (2000), *J. Appl. Cryst.* 33, 114-1148).

Hệ số tán xạ nguyên tử trung hòa được lấy từ Bảng tính thể học quốc tế (International Tables for Crystallography) (IT), Vol. C, Table 6.1.1.4. (International Tables for Crystallography, Vol.C (1992). Ed. A.J.C. Wilson, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, Table 6.1.1.4, pp. 572). Tác dụng phân tán không có quy tắc được bao gồm trong tài liệu Fcalc (Ibers, J. A. & Hamilton, W. C.; *Acta Crystallogr.*, 17, 781 (1964)); các giá trị đối với Δf và $\Delta f'$ là các giá trị của Creagh và

McAuley. (Creagh, D. C. & McAuley, W.J.; "International Tables for Crystallography", Vol C, (A.J.C. Wilson, ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, Table 4.2.6.8, pages 219-222 (1992)). Các giá trị đối với hệ số giảm khối lượng là các giá trị của Creagh và Hubbell. (Creagh, D. C. & Hubbell, J.H.; "International Tables for Crystallography", Vol C, (A.J.C. Wilson, ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, Table 4.2.4.3, các trang 200-206 (1992)). Thực hiện các tính toán sử dụng gói phần mềm tinh thể học CrystalStructure trừ phương pháp sàng lọc, mà được thực hiện bằng cách sử dụng SHELXL Version 2014/7. (*CrystalStructure 4.2*: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corporation (2000-2015). Tokyo 196-8666, Japan; *SHELXL Version 2014/7*: Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* A64, 112-122).

Số liệu tinh thể, phép đo cường độ, và giải mã cấu trúc và sàng lọc được thể hiện như sau:

A. Số liệu tinh thể

Công thức thực nghiệm	$C_{22}H_{33}N_{10}O_7P$
Trọng lượng	580,54
Màu tinh thể, dạng tinh thể	không, không
Kích thước tinh thể	không mô tả
Hệ tinh thể	đơn nghiêng
Kiểu lưới	tâm C
Số phản xạ sử dụng để xác định ô cơ sở (khoảng 2 θ)	36473 (7,7 - 147,1 $^\circ$)
Chiều rộng đỉnh quét omega ở nửa chiều cao	0,00 $^\circ$
Thông số lưới	$a = 33,3523(2) \text{ \AA}$ $b = 13,80020(11) \text{ \AA}$

	$c = 14,19956(10) \text{ \AA}$
	$\beta = 96,8075(6)^\circ$
	$V = 6489,53(8) \text{ \AA}^3$
Nhóm không gian	C2 (#5)
Giá trị Z	4
D _{tính toán}	0,594 g/cm ³
F ₀₀₀	1224,00
$\mu(\text{CuK}\alpha)$	6,011 cm ⁻¹

B. Đo cường độ

Nhiều xạ kế	
Bức xạ	CuK α ($\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$) graphit monocrom hóa
Góc hứng	2,8°
Độ mở của máy dò	2,0 - 2,5 mm theo chiều ngang 2,0 mm theo chiều dọc
Khoảng cách từ tinh thể đến máy dò	21 mm
Nhiệt độ	23,0°C
Loại quét	ω -2 θ
Tốc độ quét	0,0°/phút (theo loại ω) (đến 0 lần quét)
Chiều rộng quét	(0,00 + 0,00 tan θ)°
2 θ _{tối đa}	147,7°

Số phản xạ đo được	Tổng: 50795
	Đơn nhất: 12008 ($R_{\text{int}} = 0,0453$)
	Thương số Parsons (Flack x thông số): 4813
Hiệu chỉnh	Lorentz-phân cực hóa
	Hấp thụ
	(hệ số truyền: 0,341 - 1,000)

C. Giải mã cấu trúc và sàng lọc

Giải mã cấu trúc	Các phương pháp trực tiếp (SHELXT Version 2014/5)
Sàng lọc	Bình phương tối thiểu toàn bộ ma trận trên F^2
Hàm tối giản hóa	$\Sigma w (F_o^2 - F_c^2)^2$
Trọng lượng bình phương tối thiểu	$w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0,1000 \cdot P)^2 + 0,0000 \cdot P]$ trong đó $P = (\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2)/3$
Điểm ngắt $2\theta_{\text{tối đa}}$	$147,7^\circ$
Sự phân tán không có quy tắc	Tất cả các nguyên tử không phải hydro
Số lượng quan sát thấy (Tất cả phản xạ)	12008
Số biến	849
Tỷ lệ phản xạ/thông số	14,14
Phần dư: R_1 ($I > 2,00\sigma(I)$)	0,0522
Phần dư: R (Tất cả phản xạ)	0,0534

Phần dư: wR2 (Tất cả phản xạ)	0,1632
Chỉ số phù hợp	1,450
Thông số Flack (Thương số Parsons = 4813)	0,029(7)
Thay đổi/lỗi cực đại trong chu kỳ cuối cùng	0,001
Đỉnh cực đại trong đồ thị nhiễu xạ cuối cùng	1,79 e ⁻ /Å ³
Đỉnh cực tiểu trong đồ thị nhiễu xạ cuối cùng	-0,69 e ⁻ /Å ³

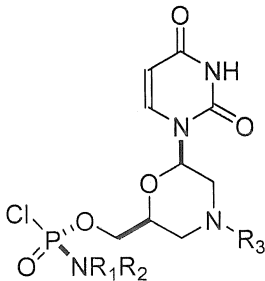
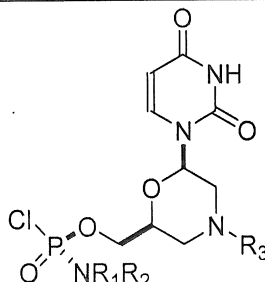
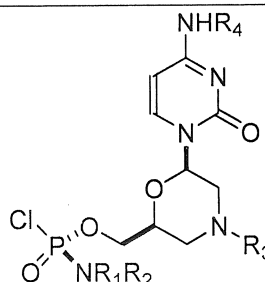
[Số liệu ¹H-NMR đối với hợp chất 100]

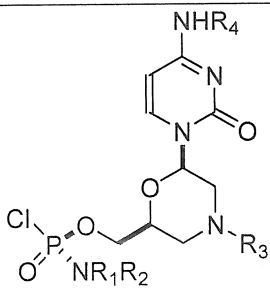
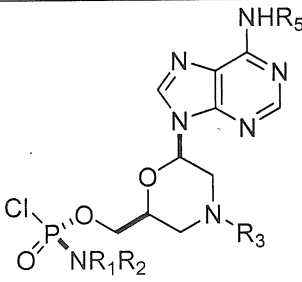
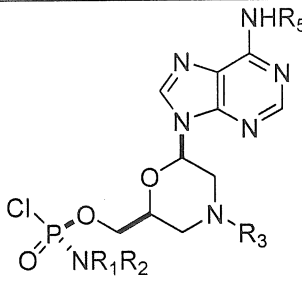
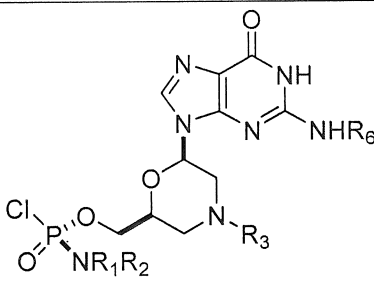
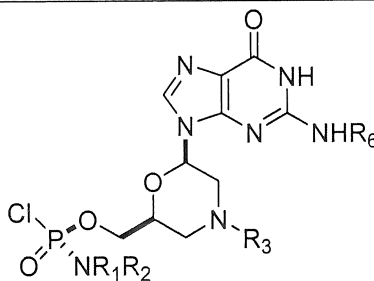
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8,25 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 5,85 (d, 1H), 5,45 (d, 1H), 4,25 (m, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 3,4 (m, 4H), 2,90 (m, 4H), 2,60 (d, 6H), 1,8 (s, 3H).

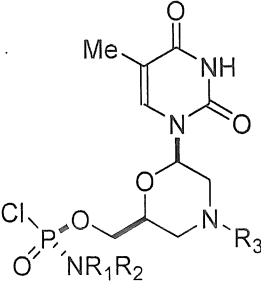
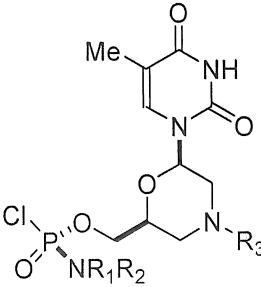
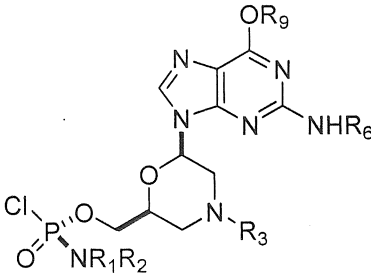
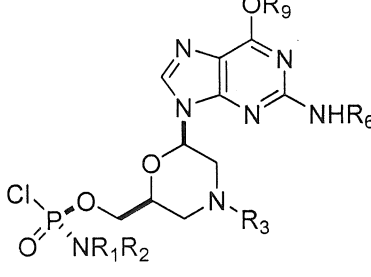
Tất cả các tài liệu nêu trong đơn này được kết hợp để tham khảo. Nếu có bất kỳ sự sai khác nào giữa tài liệu được kết hợp và tài liệu này thì dùng tài liệu này làm chuẩn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất có công thức 20, hợp chất có công thức 21, hợp chất có công thức 22, hợp chất có công thức 23, hợp chất có công thức 24, hợp chất có công thức 25, hợp chất có công thức 26, hợp chất có công thức 27, hợp chất có công thức 28, hợp chất có công thức 29, hợp chất có công thức 30, và hợp chất có công thức 31,

Hợp chất	Công thức #
	20
	21
	22

	23
	24
	25
	26
	27

	28
	29
	30
	31

trong đó R_1 và R_2 có thể là giống hoặc khác nhau, và được chọn từ nhóm bao gồm -H, C_1 - C_3 alkyl được thể tùy ý, phenyl được thể tùy ý, naphtyl được thể tùy ý, hoặc, với nitơ mà chúng gắn kết, tạo thành dị vòng được thể tùy ý, mà có thể là, ví dụ, pyrrolidin, piperazin, và morpholin;

trong đó R_3 được chọn từ nhóm bao gồm trityl (Tr), mà có thể là trityl được thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở, MMTr (p-metoxypenyldiphenylmetyl); benzyl được

thể tùy ý, 4-metoxybenzyl (PMB, MPM), 3,4-dimetoxymethyl, diphenylmethyl (Dpm), 4-metoxymethyl, và sulfonyl;

R_4 , R_5 , và R_6 được chọn từ nhóm bao gồm $-H$, $-C(O)R_7$, và $-C(O)OR_7$, trong đó R_7 được chọn từ nhóm bao gồm C1-C6 alkyl, benzyl, 2,2,2-tricloethyl, và aryl được chọn từ phenyl, 4-metoxymethyl, 4-bromophenyl, và 4-nitrophenyl;

R_9 được chọn từ nhóm bao gồm alkyl được thể tùy ý, xianoethyl, axyl, carbonat, carbamat, benzyl được thể tùy ý, 4-pivaloyloxy benzyl, và silyl,

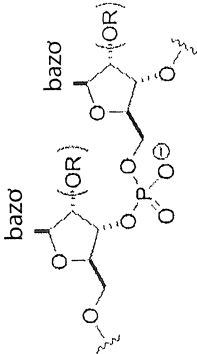
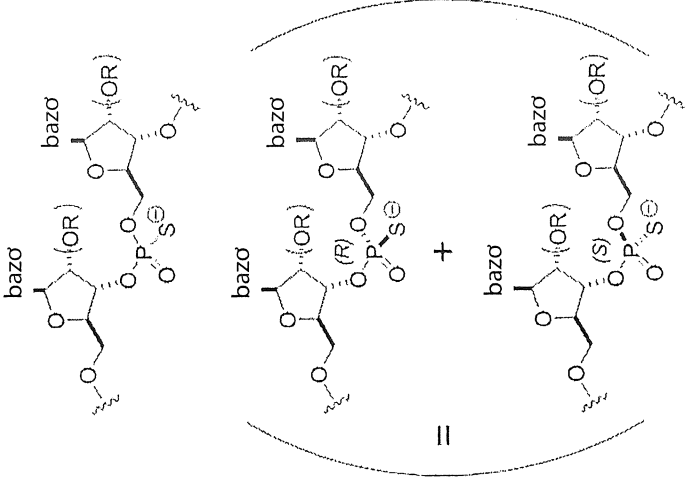
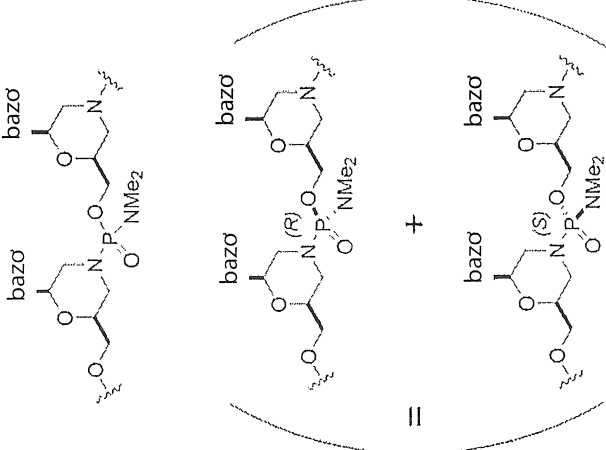
và các chất đồng phân đối ảnh của chúng; trong đó gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang là nói đến chất đồng phân không đối quang mà lượng dư đồng phân không đối quang bằng hoặc lớn hơn 87%.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó sulfonyl là sulfonyl có thể tách ra được chọn từ nhóm bao gồm 2-nitrobenzensulfonyl, 4-nitrobenzensulfonyl, và 2,4-dinitrobenzensulfonyl.

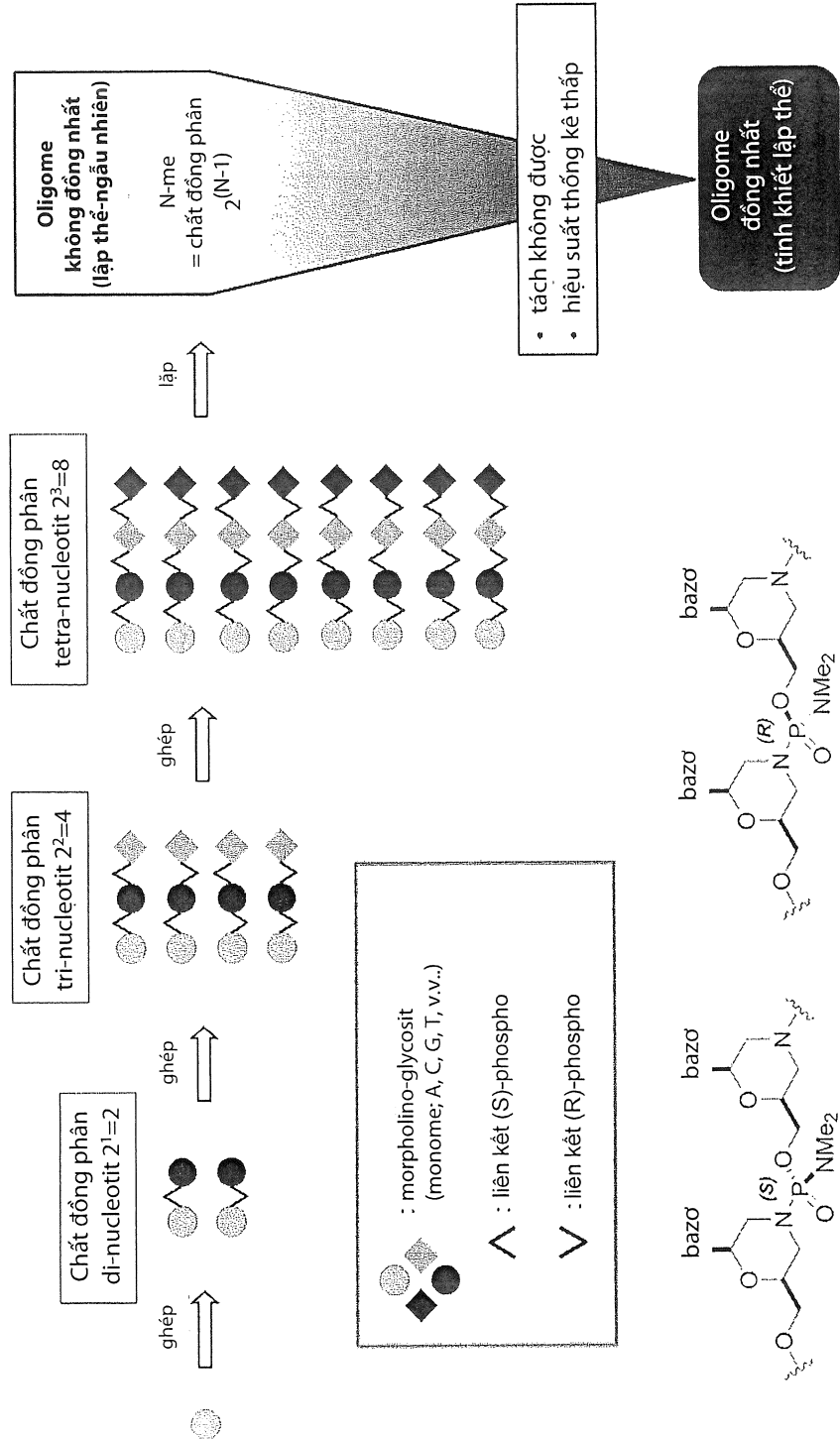
3. Phương pháp điều chế oligonucleotit tinh khiết về mặt hóa học lập thể, phương pháp này bao gồm bước phản ứng của các hợp chất gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2.

4. Chế phẩm gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang chứa hợp chất gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2.

FIG. 1

Oligonucleotit điều trị		
Oligome phosphodiester (ADN, ARN, v.v.)	Oligome phosphothioat (PS)	Oligome morpholino phosphodiamidat (PMO)
		
Phospho đối xứng	Phospho bất đối xứng	

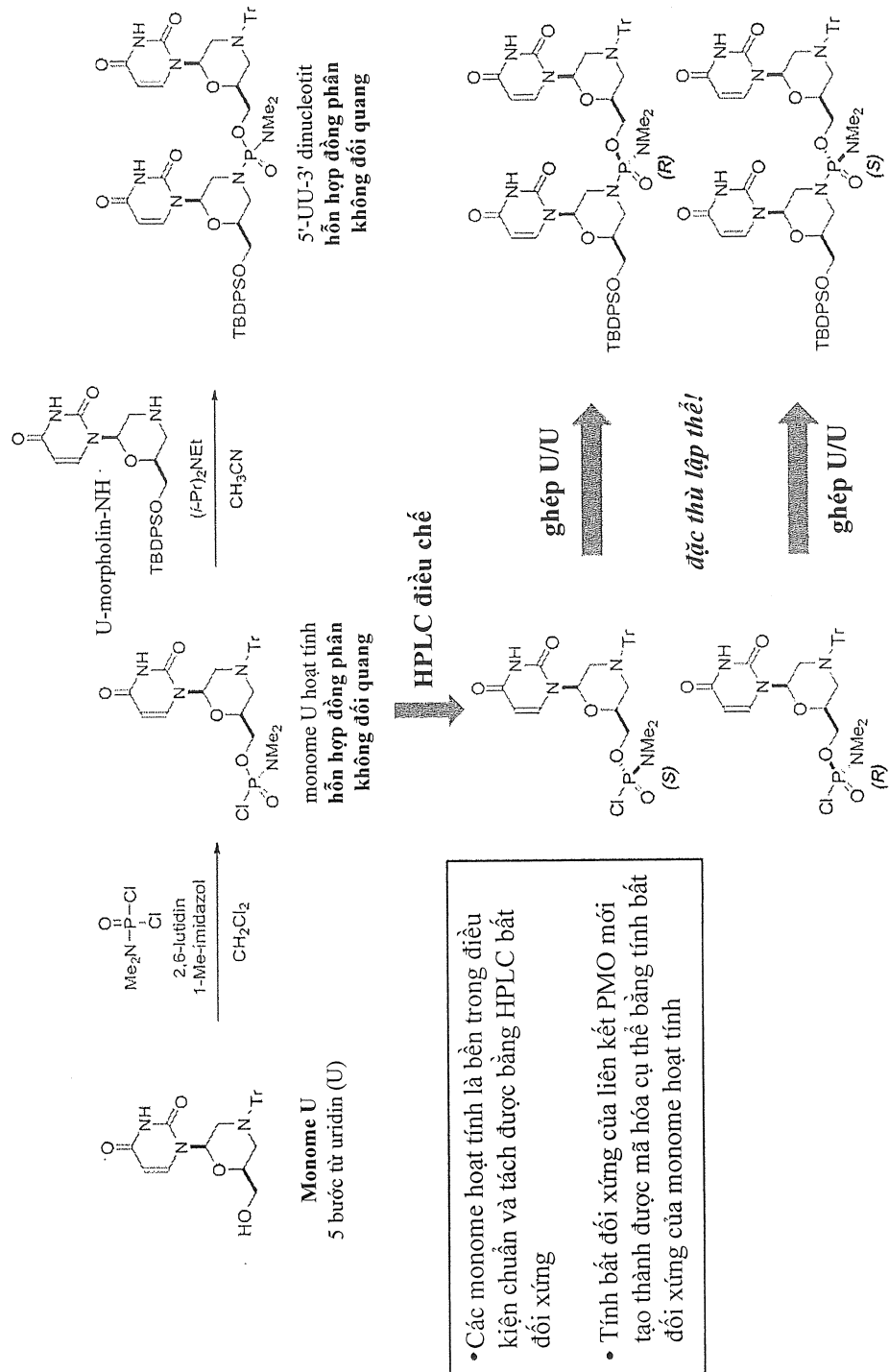
Thử thách khi tiếp cận PMO đồng nhất (tinh khiết lập thể)



3/11

FIG. 3

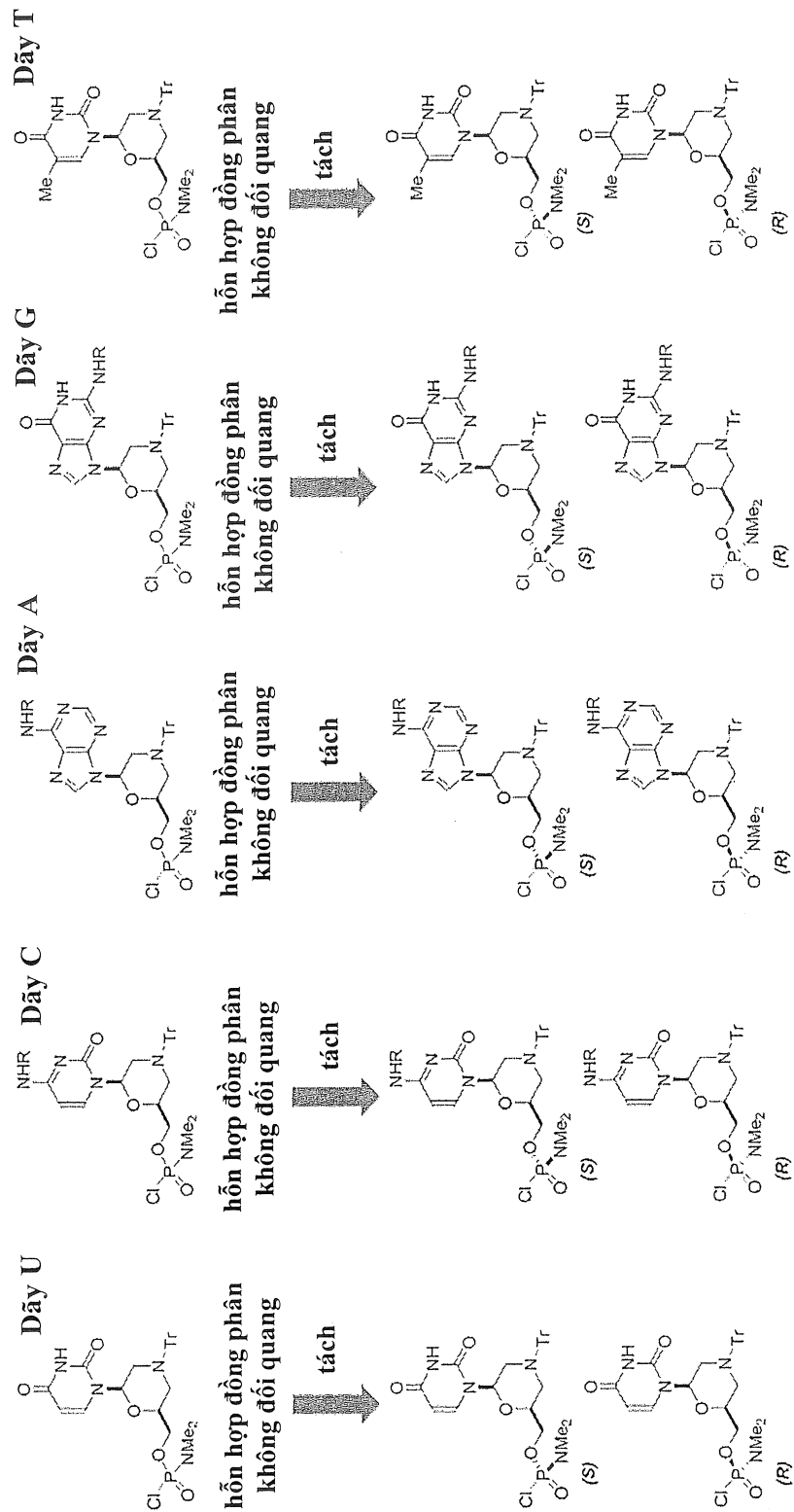
Phân giải chất đồng phân không đối quang của các monome hoạt tính và ghép PMO đặc thù lập thể



4/11

FIG. 4A

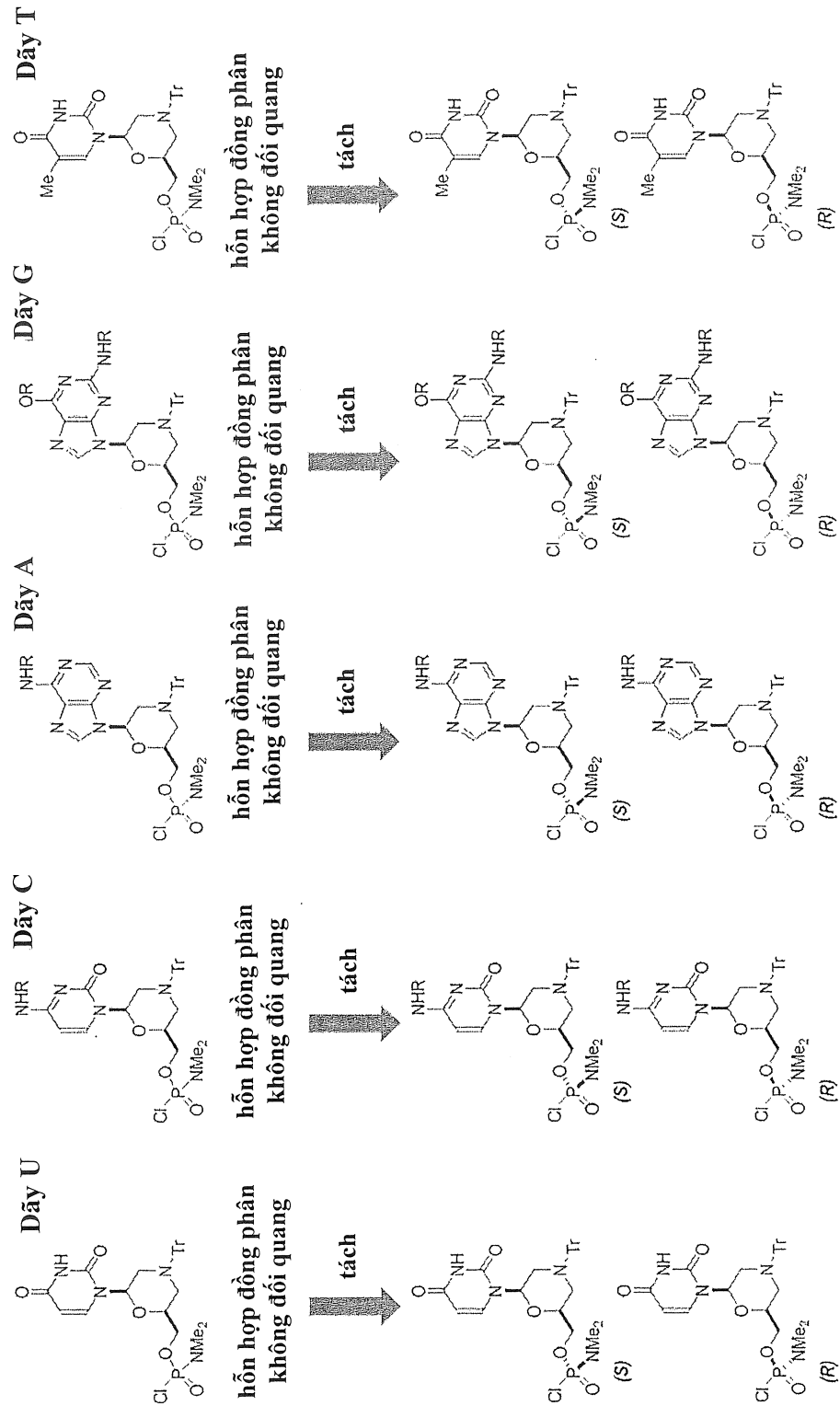
Mười "chất phản ứng" chính cấu thành oligome đồng nhất



5/11

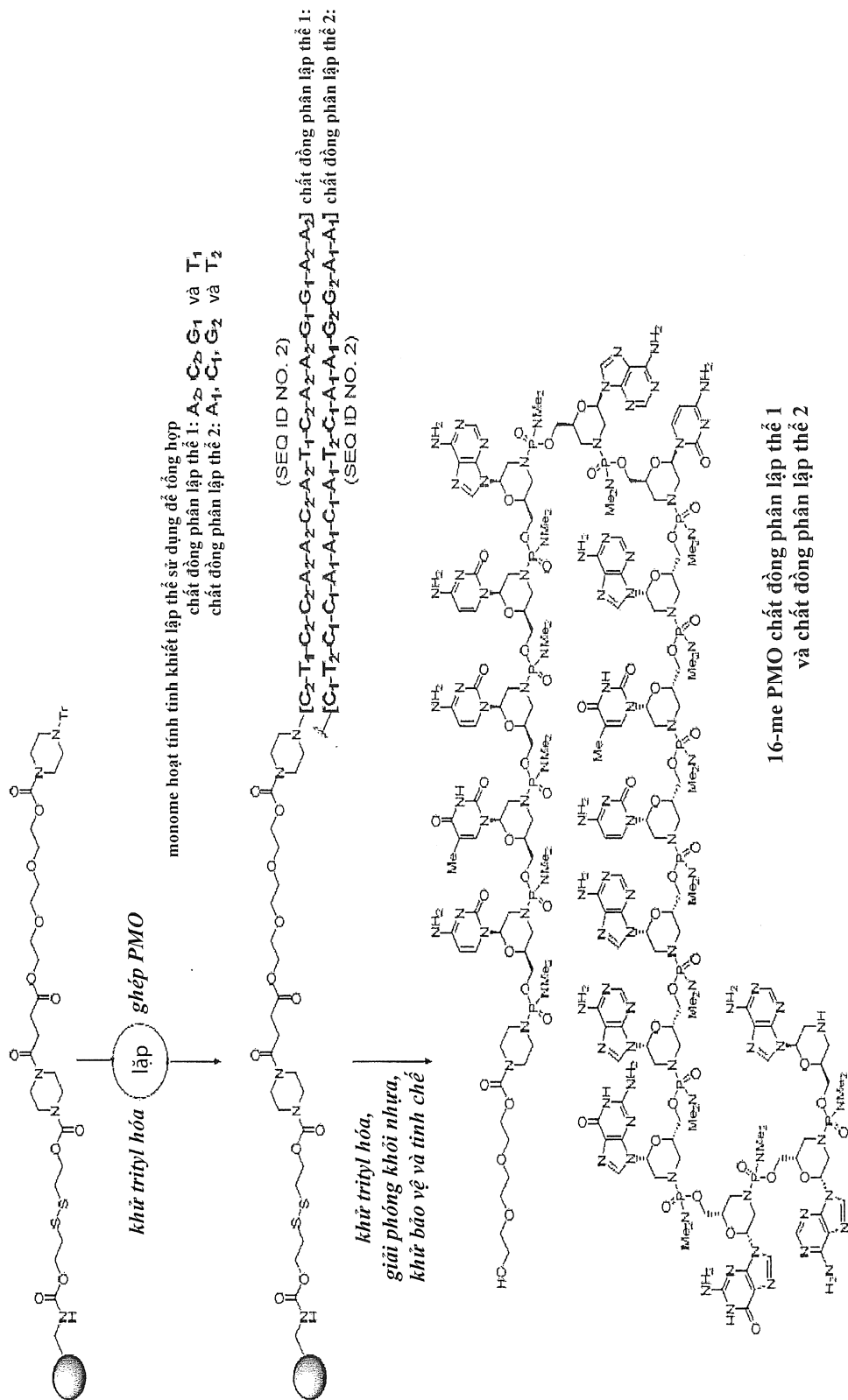
FIG. 4B

Mười "chất phản ứng" chính cấu thành oligome đồng nhất



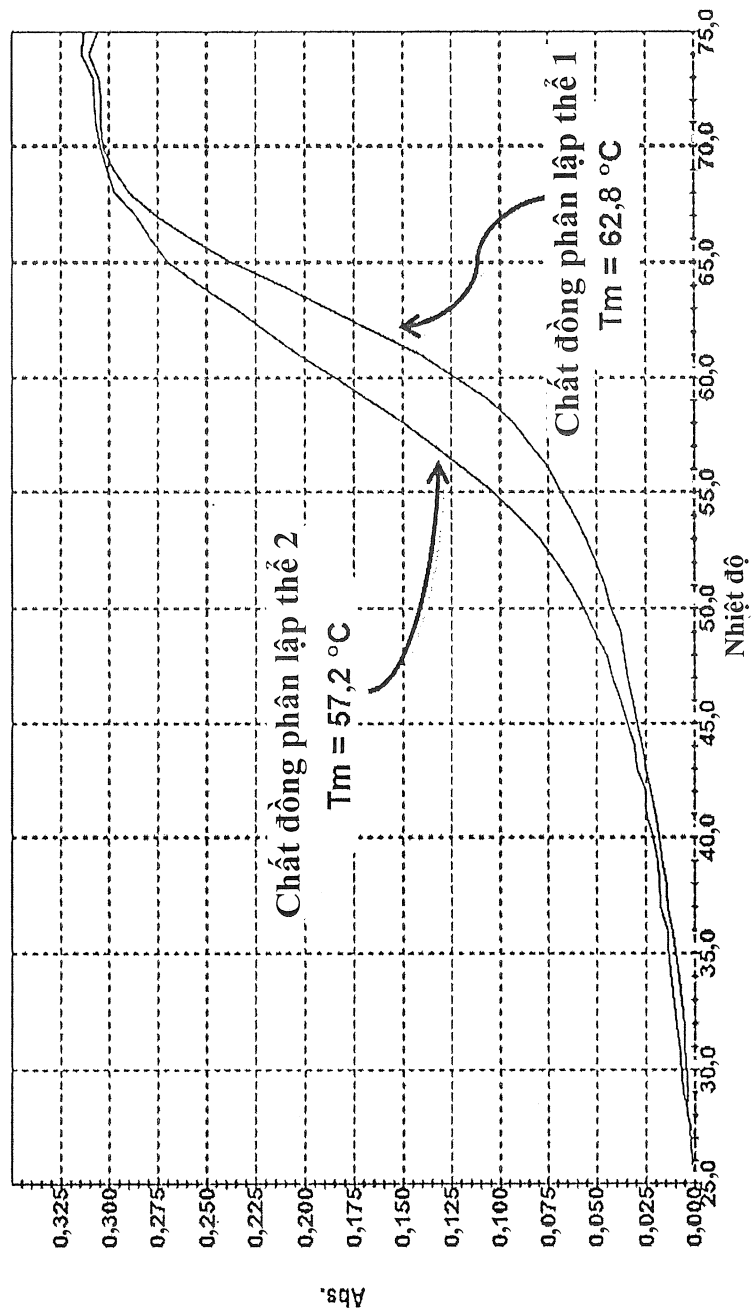
7/11

FIG. 6



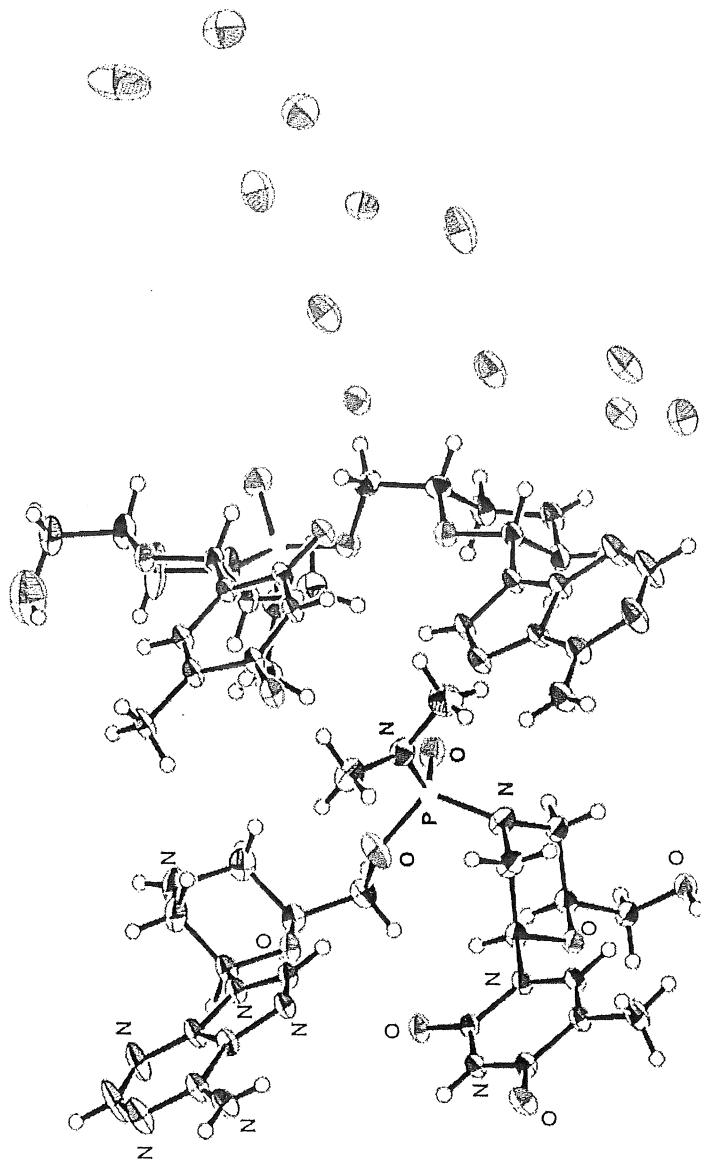
8/11

FIG. 7



9/11

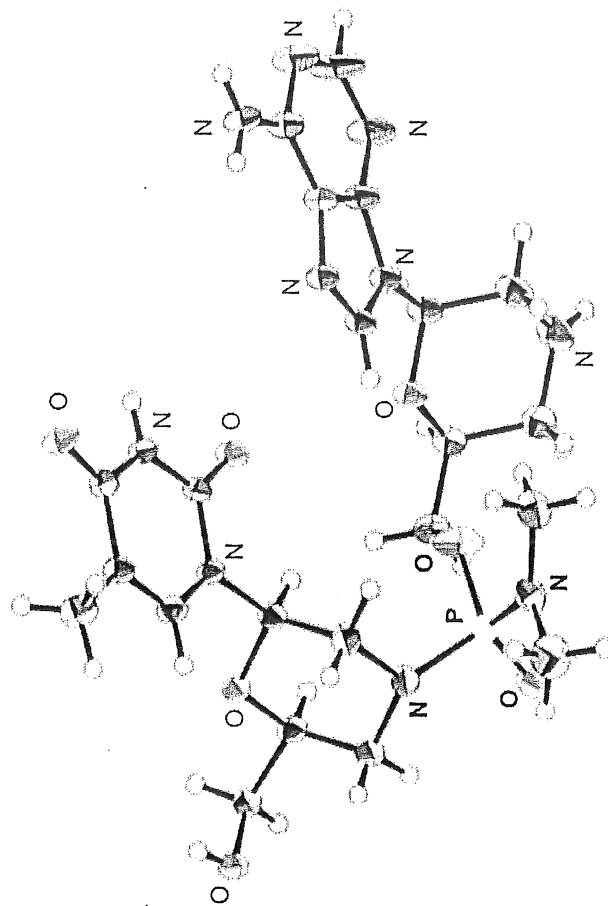
FIG. 8



10/11

FIG. 9A

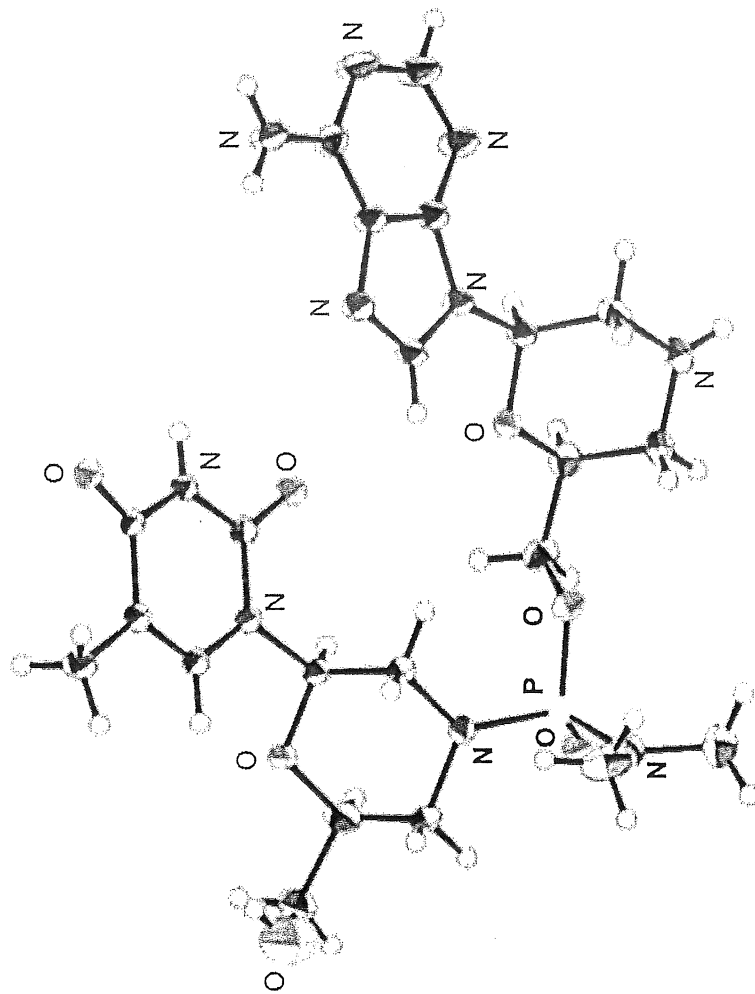
Đoạn 1



11/11

FIG. 9B

Đoạn 2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eisai R&D Management Co., Ltd.
 CHOI, Hyeong Wook
 ENDO, Atsushi
 FANG, Francis
 SHAN, Mingde
 YU, Robert T.

<120> Hợp chất gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang, chế phẩm gần như tinh khiết về mặt đồng phân không đối quang chứa hợp chất này và phương pháp điều chế oligonucleotit tinh khiết về mặt hóa học lập thể

<130> 0080171-000258

<150> US 62/201,510

<151> 2015-08-05

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ARN bổ sung được tạo ra để phân tích nhiệt độ nóng chảy

<400> 1

uuccuugaug uuggag

16

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự thử nghiệm để tổng hợp, bao gồm liên kết không tự nhiên và vòng morpholin không chuẩn

<400> 2

ctccaacatc aaggaa

16