



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0019635

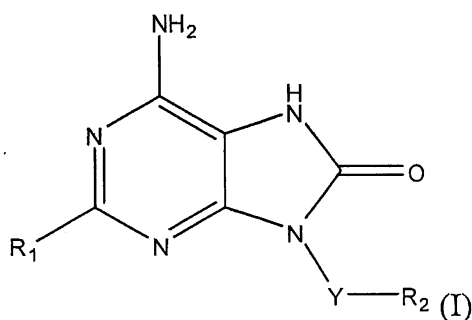
(51)⁷ **C07D 473/34, A61K 31/522, A61P 31/12, C07D 519/00**

(13) **B**

-
- (21) 1-2014-01469 (22) 08.11.2012
(86) PCT/EP2012/072090 08.11.2012 (87) WO2013/068438 16.05.2013
(30) 11188511.7 09.11.2011 EP
(45) 27.08.2018 365 (43) 25.11.2014 320
(73) JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (IE)
Eastgate Village, Eastgate, Little Island, Co Cork, Ireland
(72) BONFANTI, Jean-Francois (FR), DOUBLET, Frédéric Marc Maurice (FR),
EMBRECHTS, Werner (BE), FORTIN, Jérôme Michel Claude (FR), MC GOWAN,
David Craig (US), MULLER, Philippe (FR), RABOISSON, Pierre Jean-Marie
Bernard (FR)
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) **HỢP CHẤT PURIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH NHIỄM VIRUT**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất purin, quy trình điều chế chúng, dược phẩm chứa hợp chất purin này để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhiễm virut.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất purin, quy trình điều chế chúng, được phẩm chứa hợp chất purin này để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhiễm virut.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế mô tả việc sử dụng dẫn xuất purin trong việc điều trị bệnh nhiễm virut, rối loạn miễn dịch hoặc viêm, nhờ đó liên quan đến sự điều biến, hoặc chủ vận của thụ thể giống toll (TLR). Thụ thể giống toll là protein xuyên màng bậc một đặc trưng bởi vùng giàu loxin ngoại bào và sự mở rộng tế bào chất mà có chứa vùng bảo toàn. Hệ miễn dịch bẩm sinh có thể nhận diện mẫu phân tử liên quan đến mầm bệnh thông qua các TLR được biểu hiện trên bề mặt tế bào của loại tế bào miễn dịch nhất định. Việc nhận diện mầm bệnh lại hoạt hoá sự sản xuất xytokin và điều hoà tăng của phân tử đồng kích thích trên bề mặt thực bào. Điều này dẫn đến sự điều biến của đặc tính của tế bào T.

Ước tính rằng hầu hết các loài động vật có vú có từ mười đến mười lăm loại thụ thể giống toll. Mười ba TLR (được gọi là từ TLR1 đến TLR13) đã được xác định ở người và chuột cùng nhau, và dạng tương đương của nhiều loại trong số chúng đã được phát hiện ở các loài động vật có vú khác. Tuy nhiên, dạng tương đương của TLR đã cho được phát hiện ở người không có mặt ở tất cả các động vật có vú. Ví dụ, gen mã hoá cho protein tương tự với TLR10 ở người có mặt ở chuột, nhưng dường như đã bị làm hư hỏng ở thời điểm nào đó trong quá khứ bởi retrovirut. Mặt khác, chuột biểu hiện các TLR 11, 12, và 13, không có TLR nào trong số đó có mặt ở người. Các động vật có vú khác có thể biểu hiện TLR mà không được phát hiện ở người. Các loài không phải động vật có vú khác có thể có TLR khác biệt với động vật có vú, như được chứng minh bởi TLR14, mà được phát hiện ở cá xem sao Takifugu. Điều này có thể làm phức tạp quy trình sử dụng động vật thí nghiệm làm mô hình cho hệ miễn dịch bẩm sinh ở người.

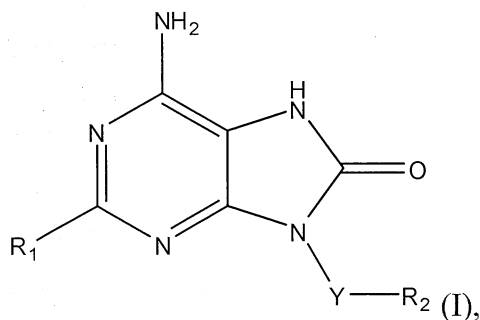
Tổng quan về thụ thể giống toll, ví dụ, xem trong bài báo: Hoffmann, J.A., Nature, 426, p33-38, 2003.

Các hợp chất thể hiện hoạt tính trên thụ thể giống toll đã được mô tả trước đây chẳng hạn như dẫn xuất purin trong tài liệu WO 2006/117670, WO 2011/049825, và WO2009/05687, dẫn xuất adenin trong tài liệu US 2007/25303, WO2008/114008, EP2138497, EP 1939198, WO 98/01448, và WO 99/28321, và pyrimidin trong tài liệu WO 2009/067081.

Tuy nhiên, vẫn rất cần có chất điều biến thụ thể giống Toll khác có độ chọn lọc tốt hơn, hiệu lực cao hơn, độ ổn định chuyển hoá cao hơn, khả năng hoà tan cao hơn và profil an toàn được cải thiện so với các hợp chất trong tình trạng kỹ thuật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo sáng chế hợp chất có công thức (I) được đề xuất:



hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình được dựng của chúng, trong đó:

Y là (C₁₋₄)alkylen,

R₁ là a heteroaryl¹ và

R₂ là aryl² hoặc heterocyclyl.

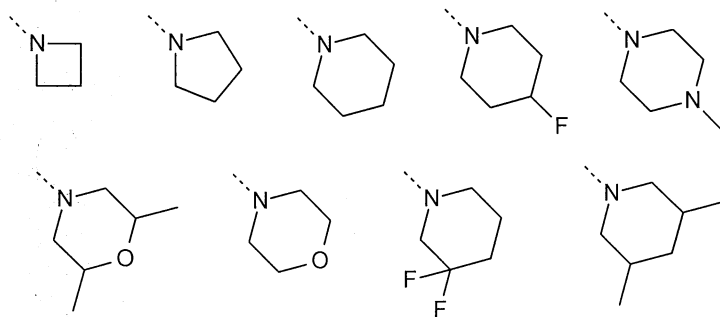
Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ heteroaryl¹ có nghĩa là imidazolyl, pyridyl, pyrimidyl, pyrrolyl, pyrazolyl, furyl, oxazolyl, oxadiazolyl, isoxazolyl, pyrazinyl hoặc thiazolyl. Heteroaryl¹ tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thể độc lập được chọn từ hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₄ alkoxy, triflometyl, C₃₋₆ xycloalkyl, phenyl, halogen, hydroxyl-C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄-alkoxy- C₁₋₄-alkyl-, hoặc C₁₋₄alkyl-dietoxyphosphoryl.

Thuật ngữ aryl² bao gồm phenyl, naphthyl, anthraxenyl và phenantrenyl và tốt hơn là phenyl. Aryl² tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₄ alkoxy, triflometyl, CO₂R₃, R₄R₅N-C₁₋₄-alkyl-, halogen, hydroxyl- C₁₋₄ alkyl-, NR₆R₇, C(O)R₆, C(O)NR₆R₇, C₁₋₄alkyl-dietoxyphosphoryl hoặc axit C₁₋₄alkyl-phosphonic.

R₃ được chọn từ H và C₁₋₆ alkyl.

R₄ và R₅ cùng với nguyên tử nitơ mà cả hai nhóm này gắn vào tạo thành dị vòng được chọn từ nhóm gồm có:



mỗi nhóm R₆ và R₇ độc lập được chọn từ H, C₁₋₆-alkyl hoặc C₁₋₄alkoxy.

Thuật ngữ “heterocyclyl” dùng để chỉ tetrahydropyran và heteroaryl².

Thuật ngữ heteroaryl² bao gồm pyridyl, tetrahydroisoquinoliny, imidazopyridinyl, quinoliny, isoquinoliny, pyrazinyl, pyrimidyl, naphthyridinyl, pyridazinyl, benzimidazolyl, benzothiazolyl, pyrazolyl, thiazolyl, imidazolyl, indazolyl. Heteroaryl² tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₄ alkoxy, oxy-C₁₋₄alkylamin hoặc pyrrolidinyl-metanon.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) trong đó R₁ được chọn từ nhóm gồm có imidazolyl, pyrazolyl hoặc pyridinyl mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halogen, hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₄ alkoxy hoặc C₃₋₆ xycloalkyl.

Hợp chất được ưu tiên theo sáng chế là các hợp chất được liệt kê trong Bảng 1 và Bảng 2 lần lượt có tiêu đề là các số sau: 1, 4, 9, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 48, 49, 50, 51 và 54.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của chúng cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Một phần của sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của chúng hoặc dược phẩm nêu trên để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của chúng hoặc dược phẩm nêu trên để sử dụng trong việc điều trị rối loạn trong đó bao gồm cả sự điều biến của TLR7.

Thuật ngữ “alkyl” dùng để chỉ hydrocacbon béo no mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa số lượng xác định của nguyên tử cacbon.

Thuật ngữ “halogen” dùng để chỉ flo, clo, brom hoặc iot.

Thuật ngữ “xycloalkyl” dùng để chỉ vòng carboxyclic chứa số lượng xác định của nguyên tử cacbon.

Thuật ngữ “alkoxy” dùng để chỉ nhóm alkyl (mạch cacbon và hydro) được liên kết đơn với oxy giống như trong trường hợp nhóm metoxy hoặc nhóm etoxy.

Muối dược dụng của hợp chất có công thức (I) bao gồm muối cộng axit và muối bazơ của chúng. Muối cộng axit thích hợp được tạo thành từ axit mà tạo thành muối không độc. Muối bazơ thích hợp được tạo thành từ bazơ mà tạo thành muối không độc.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể tồn tại ở dạng solvat hoá và không solvat hoá. Thuật ngữ “solvat” được dùng trong bản mô tả này để mô tả phức hợp phân tử chứa hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử dung môi dược dụng, ví dụ, etanol.

Thuật ngữ “chất đa hình” dùng để chỉ khả năng của hợp chất theo sáng chế tồn tại ở nhiều hơn một dạng hoặc cấu trúc tinh thể.

Hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng gọi là “(các) tautome” dùng để chỉ chất đồng phân của hợp chất hữu cơ mà dễ dàng chuyển đổi qua lại bằng phản ứng hoá học gọi là phản ứng tautome hoá. Phản ứng này dẫn đến sự dịch chuyển hình dạng của

nguyên tử hydro hoặc proton, kèm theo sự chuyển đổi của liên kết đơn và liên kết đôi liên kề.

Hợp chất theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng sản phẩm kết tinh hoặc vô định hình. Chúng có thể thu được ví dụ dưới dạng bánh rắn, bột, hoặc màng bằng các phương pháp chẳng hạn như phương pháp kết tủa, phương pháp kết tinh, phương pháp làm đông khô, phương pháp phun khô, hoặc phương pháp làm khô bằng cách làm bay hơi. Chúng có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất khác theo sáng chế hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thuốc khác. Thông thường, chúng có thể được dùng dưới dạng chế phẩm kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng. Thuật ngữ “tá dược” được dùng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ không phải là (các) hợp chất theo sáng chế. Việc lựa chọn tá dược phụ thuộc nhiều vào các yếu tố chẳng hạn như phương thức dùng cụ thể, hiệu quả của tá dược lên khả năng hoà tan và độ ổn định, và bản chất của dạng liều lượng.

Hợp chất theo sáng chế hoặc nhóm phụ bất kỳ của chúng có thể được tạo chế phẩm thành các dạng dược phẩm khác nhau cho các mục đích sử dụng khác nhau. Đối với dược phẩm thích hợp, có thể trích dẫn ra tất cả các dược phẩm thường được sử dụng làm thuốc dùng toàn thân. Để bào chế dược phẩm theo sáng chế, lượng hữu hiệu của hợp chất cụ thể, tùy ý ở dạng muối cộng, làm thành phần hoạt tính được kết hợp trong hỗn hợp nhuỷên với chất mang dược dụng, mà chất mang này có thể có nhiều dạng tùy thuộc vào dạng của chế phẩm mong muốn để sử dụng. Các dược phẩm này mong muốn ở dạng liều lượng đơn thích hợp, ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, qua đường trực tràng, hoặc dưới da. Ví dụ, trong việc bào chế dược phẩm ở dạng liều lượng dùng qua đường miệng, môi trường dược thông dụng bất kỳ có thể được sử dụng chẳng hạn như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và chất tương tự trong trường hợp của chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng chẳng hạn như huyền phù, si rô, cồn ngọt, nhũ tương, và dung dịch; hoặc chất mang rắn chẳng hạn như tinh bột, đường, cao lạnh, chất pha loãng, chất bôi trơn, chất liên kết, chất phân tán và chất tương tự trong trường hợp của bột, viên tròn, viên nang, và viên nén. Do dễ sử dụng, nên viên nén và viên nang là dạng đơn vị liều lượng dùng qua đường miệng có lợi thế nhất, trong trường hợp đó chất mang dược rắn hiển nhiên được sử dụng. Cũng được bao gồm là chế phẩm dạng rắn mà có thể được chuyển hoá, ngay trước khi sử dụng, thành dạng lỏng. Trong

được phẩm thích hợp để dùng dưới da, chất mang tùy ý chứa chất tăng thấm và/hoặc chất làm ẩm thích hợp, tùy ý kết hợp với chất phụ gia thích hợp có bản chất bất kỳ ở tỷ lệ nhỏ, mà chất phụ gia không gây ra tác dụng có hại đáng kể lên da. Chất phụ gia này có thể thuận lợi sử dụng cho da và/hoặc có thể hữu dụng để điều chế được phẩm mong muốn. Các được phẩm này có thể được dùng theo nhiều cách, ví dụ, dưới dạng miếng dán qua da, dưới dạng được phẩm chính xác, dưới dạng thuốc mỡ. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng bằng cách xông hoặc bơm khí bằng phương pháp và dạng chế phẩm được dùng trong lĩnh vực để sử dụng bằng cách này. Do đó, nhìn chung hợp chất theo sáng chế có thể được dùng cho phối ở dạng dung dịch, huyền phù hoặc bột khô.

Đặc biệt có lợi theo sáng chế là để bào chế được phẩm nêu trên ở dạng liều đơn vị để dễ dàng sử dụng và đồng nhất về liều lượng. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp làm liều đơn vị, mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết. Ví dụ về dạng liều đơn vị này là viên nén (bao gồm viên nén có rãnh hoặc được bao), viên nang, viên tròn, gói bột, viên nhện, thuốc đạn, dung dịch hoặc huyền phù tiêm và dạng tương tự, và phức hợp phân tách của chúng.

Chuyên gia trong lĩnh vực điều trị các bệnh nhiễm trùng sẽ có thể xác định lượng hữu hiệu từ kết quả thử nghiệm được thể hiện dưới đây. Nhìn chung, dự định rằng lượng hàng ngày hữu hiệu sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 mg/kg đến 50 mg/kg trọng lượng cơ thể, tốt hơn là từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg trọng lượng cơ thể. Có thể thích hợp để dùng liều lượng cần thiết dưới dạng hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn liều phụ ở các khoảng thời gian thích hợp trong cả ngày. Liều phụ này có thể được tạo chế phẩm dưới dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa từ 1 đến 1000mg, và cụ thể là từ 5 đến 200mg thành phần hoạt tính trong mỗi dạng liều đơn vị.

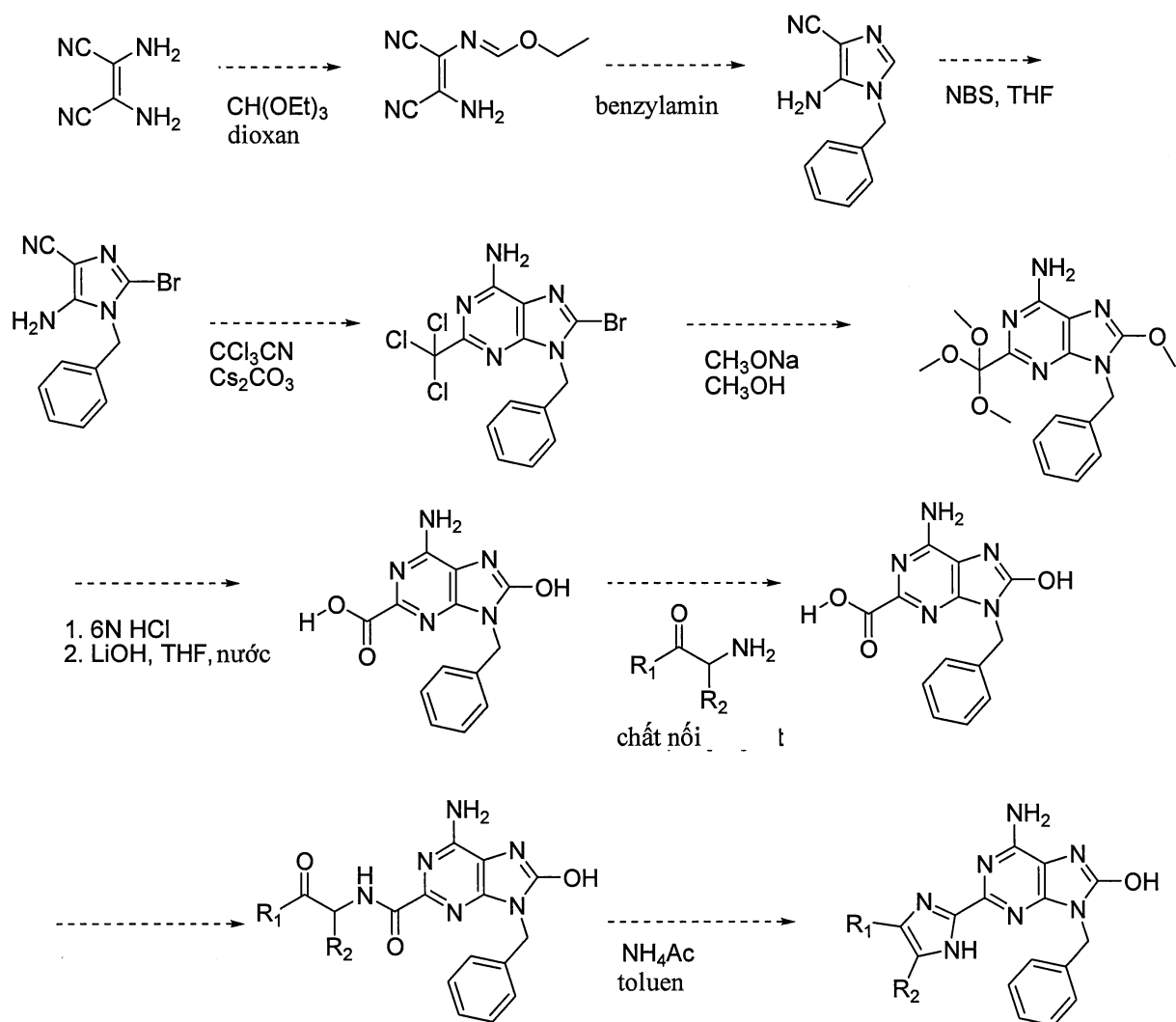
Liều lượng chính xác và tần suất sử dụng phụ thuộc vào hợp chất cụ thể có công thức (I) được sử dụng, tình trạng bệnh cụ thể cần điều trị, độ trầm trọng của tình trạng bệnh cần điều trị, độ tuổi, cân nặng và tình trạng sinh lý chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà cá thể có thể dùng, như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, có bằng chứng là lượng hữu hiệu có thể

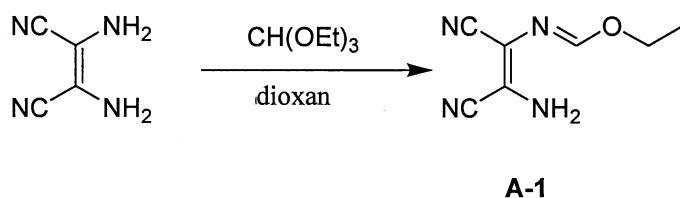
giảm đi hoặc tăng lên tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào đánh giá của thầy thuốc kê đơn hợp chất theo sáng chế. Do đó, các khoảng lượng hữu hiệu nêu trên chỉ là hướng dẫn và không nhằm làm giới hạn phạm vi hoặc việc sử dụng sáng chế ở mức độ bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần thử nghiệm

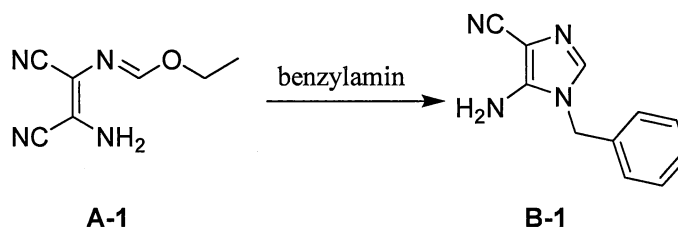
Sơ đồ chung của phương pháp điều chế hợp chất cuối cùng (Phương pháp 1)





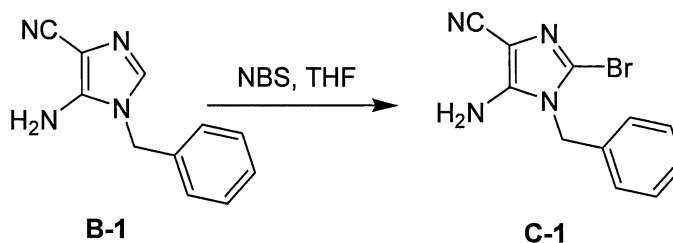
Điều chế hợp chất trung gian A-1

Diaminomaleonitril (6g, 55mmol) và triethylorthoformat (9,2ml, 55mmol) được kết hợp trong 1,4-dioxan (95ml) và được gia nhiệt trong điều kiện chung cất đến khi thu được 65ml của 1,4-dioxan/etanol được thu lấy. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội xuống đến nhiệt độ trong phòng và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột sử dụng gradien từ ete dầu mỏ đến 25% etyl axetat trong ete dầu mỏ để tạo ra 5g A-1.



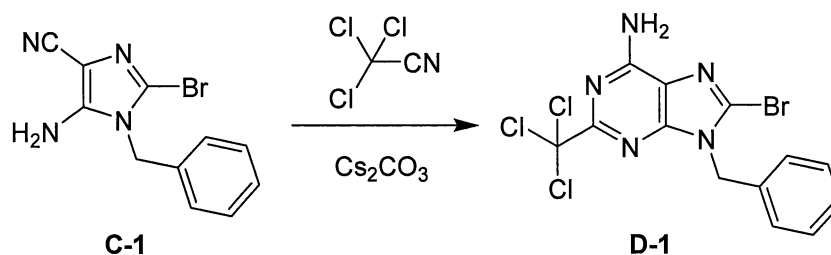
Điều chế hợp chất trung gian B-1

Benzylamin (2,86ml, 26,3mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch chứa A-1 (4,1g, 25mmol) và anilin hydroclorua (50 mg) trong etanol (80ml), khuấy ở nhiệt độ 10°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng được bổ sung từng giọt vào dung dịch NaOH 1M (50ml), khuấy ở nhiệt độ 10°C, và huyền phù thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Chất rắn được thu lấy bằng cách lọc, được rửa bằng nước và được làm khô trong chân không. Hợp chất nêu ở đề mục này được thu dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt, B-1 (4g).



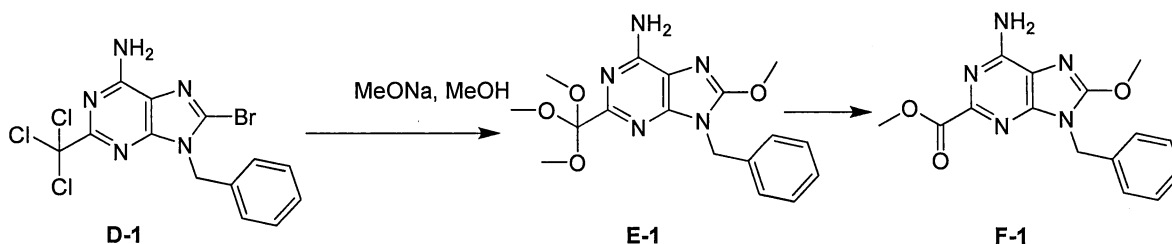
Điều chế hợp chất trung gian C-1

N-bromosuccinimit (4g, 22mmol) được bổ sung từng phần vào huyền phù chứa B-1 (4g, 20mmol) trong THF (50ml) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút. Dung môi được làm bay hơi trong chân không và phần còn lại được chiết từ dung dịch bão hoà trong nước chứa NaHCO_3 (50ml) với etyl axetat (300ml), được làm khô bằng Na_2SO_4 , chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi chứa dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột sử dụng gradien diclometan đến 5% metanol trong diclometan. Các phân đoạn tốt nhất được thu gom, dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được chất rắn màu hồng, C-1 (3g).



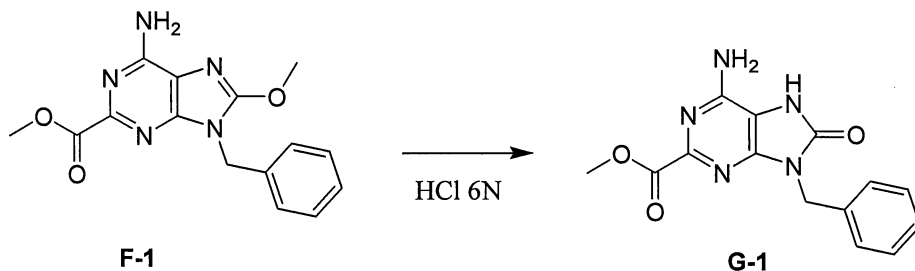
Điều chế hợp chất trung gian D-1

Tricloaxetonitril (4,8g, 17,3mmol) được bổ sung vào huyền phù chứa C-1 (4g, 14,4mmol) và Cs_2CO_3 (9,4g, 29mmol) trong toluen (50ml) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 48 giờ. Hỗn hợp được rót vào nước (100ml) và được chiết bằng etyl axetat (3 x 50ml), được làm khô bằng Na_2SO_4 , chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc, và dịch lọc được cô trong chân không. Phần còn lại được tạo huyền phù trong etanol (20ml) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Chất rắn tạo thành được thu gom bằng cách lọc và được rửa bằng metanol để tạo ra chất rắn màu trắng nhạt, D-1 (2,7 g).



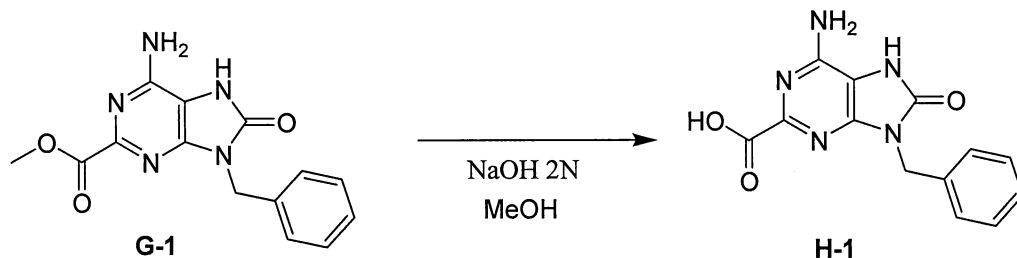
Điều chế hợp chất trung gian F-1

Natri metoxit (2,4g, 0,06mol) được bổ sung vào huyền phù chứa D-1 (5g, 12mmol) trong metanol (100ml) và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ hồi lưu trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp được làm nguội trong bể nước đá và được làm dừng bằng nước. Metanol được làm bay hơi trong chân không và phần còn lại được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được làm khô và được cô để thu được F-1 (4,6g, chất thô).



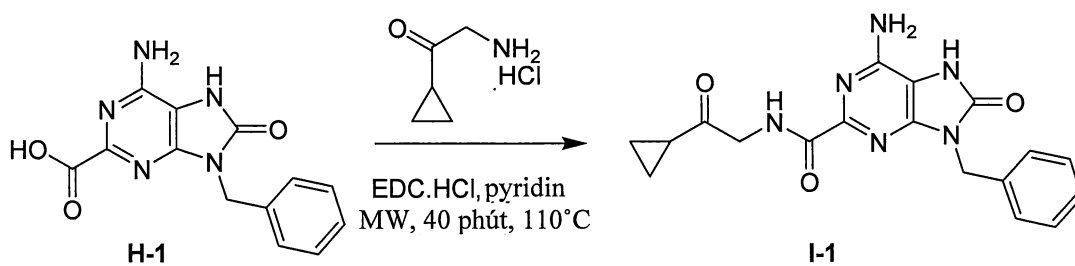
Điều chế hợp chất trung gian G-1

Hợp chất trung gian F-1 (4,6g, 15mmol) được tạo huyền phù trong dung dịch HCl 6N (trong nước) (75ml) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong thời gian 32 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được trung hoà bằng amoniac và chất kết tủa thu được được thu lấy bằng cách lọc và được rửa bằng nước để thu được G-1 (3,2g).



Điều chế hợp chất trung gian H-1

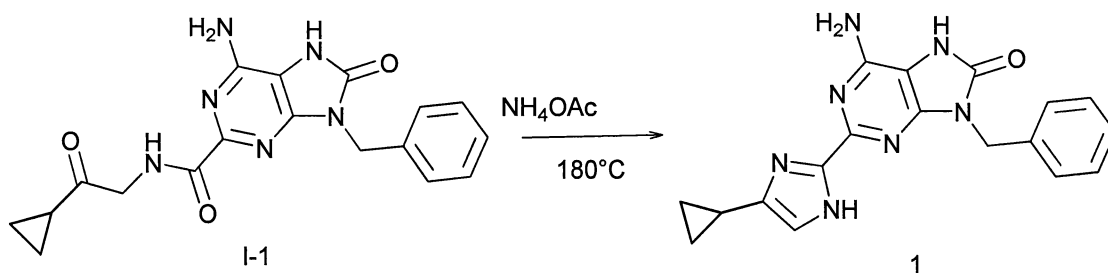
Dung dịch NaOH 2N (trong nước) được bổ sung vào dung dịch của G-1 (1g, 3,34mmol) trong metanol (50ml) và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Metanol được loại bỏ dưới áp suất giảm và hỗn hợp phản ứng được axit hoá đến độ pH bằng 2 bằng dung dịch HCl 2N (trong nước). Chất kết tủa tạo thành được thu lấy bằng cách lọc và được rửa bằng nước để thu được H-1 (0,95g).



Phương pháp điều chế hợp chất trung gian I-1

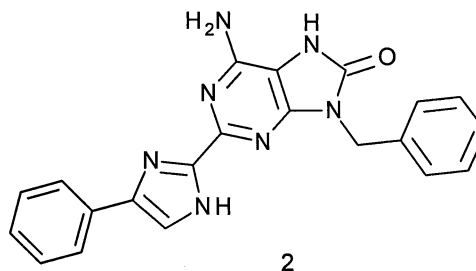
Hỗn hợp của H-1 (500mg, 1,4mmol), aminoketon 2 (284mg, 1,6mmol) và EDCI (460mg, 2,4mmol) trong pyridin (10ml) được gia nhiệt trong vi sóng đến 110 độ C trong thời gian 0,5 giờ. Hỗn hợp được cô để tạo ra sản phẩm thô mà được rửa bằng axetonitril (10ml) và nước lạnh để tạo ra sản phẩm hợp chất trung gian I-1, dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (0,5 g).

Hợp chất 1



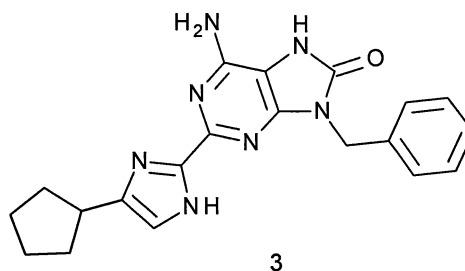
NH_4OAc (5g) được bổ sung vào lọ và được gia nhiệt trong bể dầu đến khi nóng chảy. Sau đó, I-1 (100 mg) được bổ sung và hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt trong vi sóng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 180°C. Hỗn hợp được rót vào nước và được chiết bằng dung môi hữu cơ hỗn hợp (diclometan:isopropanol 3:1, 2 x 60ml), được làm khô và được cô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế để thu được chất rắn màu vàng, 1 (105mg).

Hợp chất 2



Hợp chất 2 được tổng hợp theo quy trình để tổng hợp hợp chất 1 (230mg).

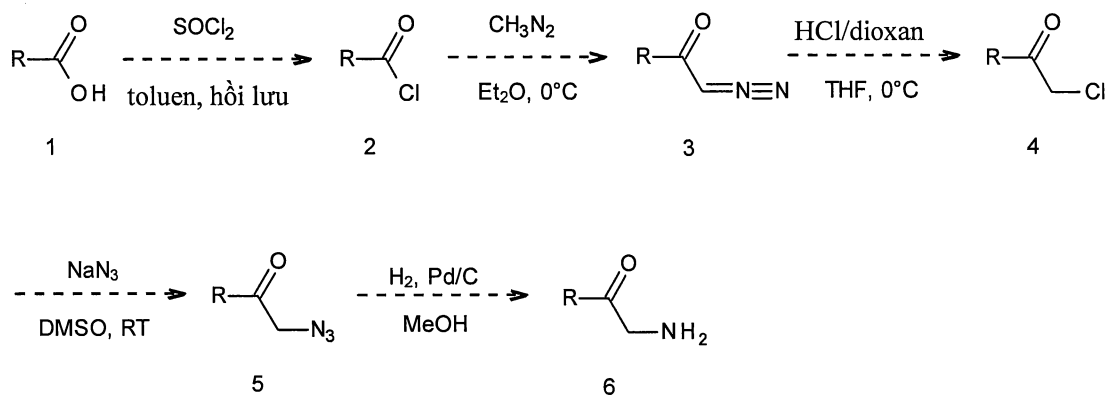
Hợp chất 3



Hợp chất 3 được tổng hợp theo quy trình để tổng hợp hợp chất 1 (205mg).

Quy trình chung để điều chế aminoketon

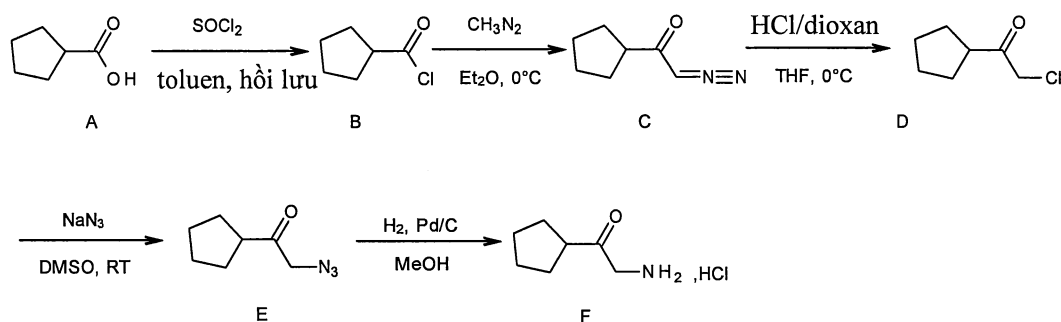
Sơ đồ hoá học chung



Axit carboxylic (1) được chuyển hoá thành clorua axit tương ứng 2 nhờ thionyl clorua. Cũng có thể sử dụng chất clo hoá khác, ví dụ oxalyl clorua hoặc phospho oxyclorua. Clorua axit (2) được xử lý bằng diazometan ở nhiệt độ thấp hơn để thu được diazoketon (3). Diazoketon (3) được chuyển hoá thành alfa-cloketon của nó (4) thông qua việc bổ sung axit clohydric ở nhiệt độ thấp. Clo của alfa-cloketon (4) được thay thế bằng azit, từ nguồn azit thích hợp như natri azit, trong sự có mặt của, thông thường là, dung môi không proton lưỡng cực, ví dụ DMSO.

Điều chế aminoketon 1.

Sơ đồ phản ứng



Bước 1. Bổ sung SOCl_2 (15ml) vào dung dịch của A (15g, 0,13mol) trong toluen (50ml). Hỗn hợp phản ứng được hồi lưu trong thời gian 3 giờ. Toluene được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm clorua axit thu được dưới dạng chất lỏng màu nâu (16g) và được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

Bước 2. Bổ sung CH_2N_2 (200ml) vào dung dịch của B (16g, 0,12 mol) trong diethyl ether (100ml) ở nhiệt độ 0°C . Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ này. Ether được loại bỏ trong chân không ở nhiệt độ trong phòng. Sản phẩm được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (gel silic oxit, dung môi rửa giải: ether dầu mỏ: ethyl axetat 10:1) để tạo ra C (12g).

^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 5,18 (br. s., 1H), 2,65 (br. s., 1H), 1,45 - 1,81 (m, 8H).

Bước 3. Bổ sung từng giọt HCl 4N/dioxane vào dung dịch của C (12g, 0,096mol) trong THF (65ml) ở nhiệt độ 0°C . Phản ứng được kiểm tra bằng TLC. Phản ứng được trung hòa bằng NaHCO_3 (bão hòa trong nước). Hỗn hợp được chiết bằng ethyl axetat (2 x 150ml), được làm khô và được cô để tạo ra D (11g). Sản phẩm này được sử dụng ngay lập tức cho bước tiếp theo.

^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 4,10 (s, 2H), 3,04 (quin, $J=7,3\text{Hz}$, 1H), 1,54 - 1,87 (m, 8H)

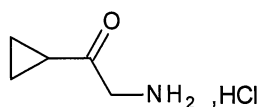
Bước 4. Bổ sung NaN_3 (3,9g, 0,06mol) vào dung dịch của D (7,3g, 0,05mol) trong DMSO (30ml). Phản ứng được khuấy qua đêm và được kiểm tra bằng TLC. Phản ứng được rót vào nước (50ml) và được chiết bằng ethyl axetat (2 x 100ml), được làm khô bằng natri sulfat, chất rắn được loại bỏ bằng cách lọc và dung môi chứa dịch lọc được loại bỏ dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký gel silic oxit bằng cách sử dụng gradien ether dầu mỏ đến ethyl axetat để thu được E (5,28g).

^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 3,93 (s, 2H), 2,83 (quin, $J=7,3$ Hz, 1H), 1,56 - 1,84 (m, 8H)

Bước 5. Hỗn hợp của E (3,28g, 0,02mol), HCl đậm đặc (1,8ml, 0,02 mol) và 1g Pd/C (10%) trong 30ml của metanol được khuấy qua đêm dưới áp suất $344,74 \cdot 10^3$ Pa (50psi) của khí quyển hydro. Hỗn hợp phản ứng được lọc và được cô để tạo ra aminoketon-1 (2g).

^1H NMR (MeOD, 400MHz): δ (ppm) 4,03 (s, 2H), 3,01 - 3,12 (quin, $J=7,3$ Hz, 1H), 1,67 - 1,98 (m, 8H)

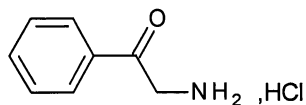
Aminoketon-2



Aminoketon 2

Aminoketon-2 được điều chế theo quy trình để điều chế aminoketon-1.

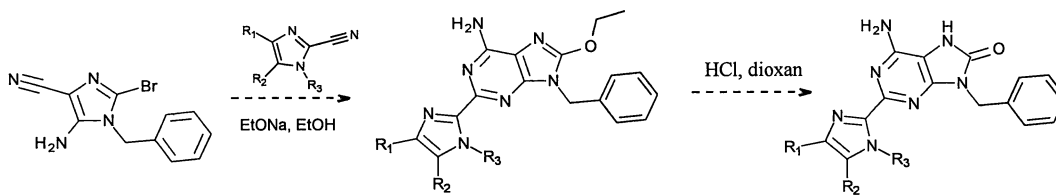
Aminoketon 3



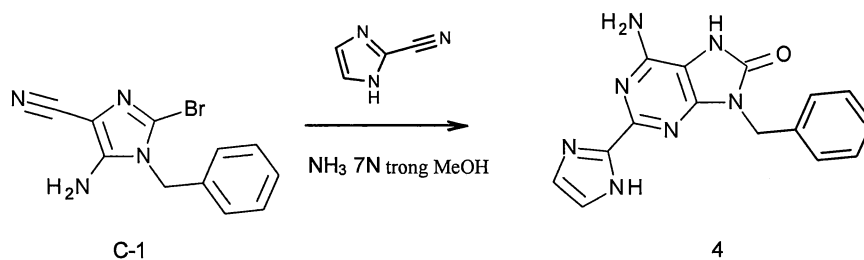
Aminoketon 3

Aminoketon-3 được điều chế theo quy trình để điều chế aminoketon-1.

Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 2)

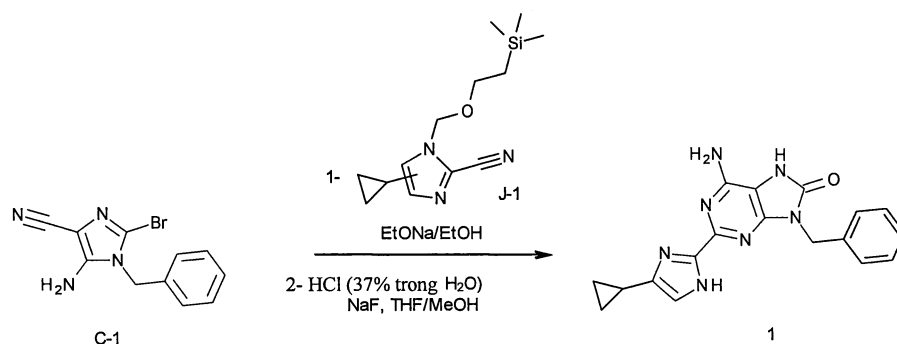


Điều chế hợp chất 4



Hỗn hợp của C-1 (1,6g, 5,78mmol) (phương pháp tổng hợp nó như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO20060117670 ở các trang 59-60: “Điều chế 6, 7 và 8” lần lượt để thu được 5-amino-1-benzyl-2-bromo-1H-imidazol-4-carbonitril) và 2-cyanoimidazol (592mg, 6,35mmol) trong NH_3/MeOH (7N) (60ml) được khuấy ở nhiệt độ 140°C trong thời gian 48 giờ trong bình phản ứng chịu áp. Dung môi được làm bay hơi. Hợp chất thô được tinh chế bằng sắc ký cột trên cột gel silic oxit (15-40 μm , 40g), trong DCM/MeOH/ NH_4OH 97/3/0,5 $\rightarrow$ 95/5/0,5 để tạo ra hợp chất 4 (78mg, hiệu suất 4,4%).

Phương pháp tổng hợp thay thế của hợp chất 1



Bước 1:

EtONa (904mg; 13,3mmol) được bổ sung vào dung dịch của 2-cyanoimidazol I-1 (0,7g; 2,66mmol) và hợp chất trung gian C-1 (736mg; 2,66mmol) trong EtOH (30ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 16 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 45g Merck, pha động 97/3/0,1 đến 95/5/0,5) để tạo ra 0,51g hợp chất trung gian etoxy được bảo vệ bằng SEM dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (hiệu suất 38%).

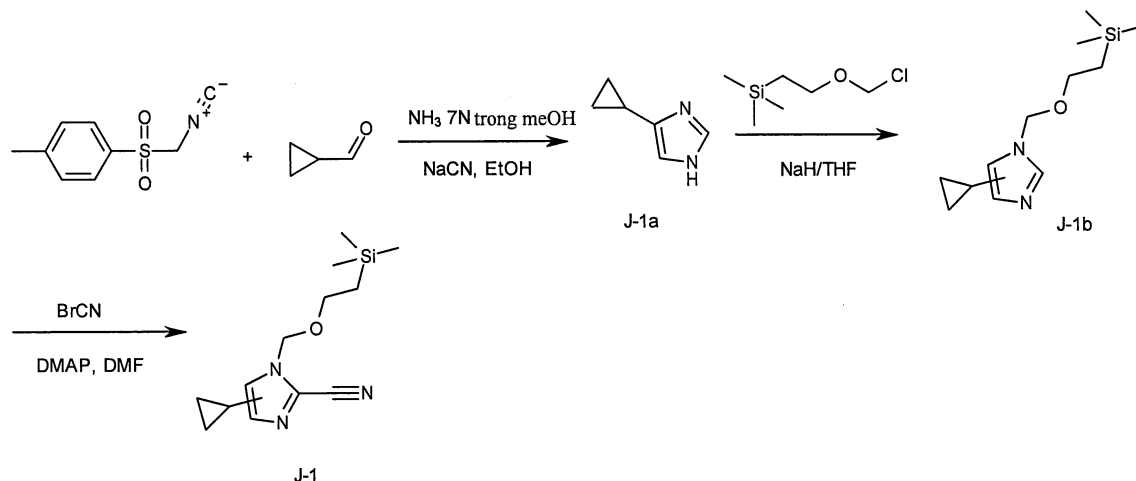
HPLC R_t (phút) = 7,45; MS M^+ (H^+): 506 phương pháp (v2003v2002)

Bước 2:

NaF (170mg; 4,05mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian etoxy được bảo vệ bằng SEM (0,41g; 0,811mmol) trong THF (28ml), HCl (37% trong H₂O) (28ml) và MeOH (10ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp được làm nguội xuống đến nhiệt độ trong phòng và dung dịch 10% của K₂CO₃ được bổ sung đến khi độ pH của dung dịch là kiềm. Lớp nước được làm bão hoà bằng bột K₂CO₃ và sản phẩm được chiết bằng DCM/MeOH (5%) (3 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40µm, pha động DCM/MeOH/NH₃ trong nước 95/5/0,5 đến 90/10/0,5) để tạo ra 120mg hợp chất 1 dưới dạng bột màu trắng (hiệu suất 43%).

Tổng hợp hợp chất trung gian 2-xyano-imidazol

Tổng hợp hợp chất trung gian J-1



NaCN (360mg; 7,35mmol) được bổ sung vào huyền phù chứa cyclopropanecarboxaldehyt (5g; 71,3mmol) và tosylmethyl-isocyanua (13,7g; 69,9mmol) trong EtOH (200ml). Hỗn hợp thu được được khuấy trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần còn lại được rửa bằng hỗn hợp của heptan/ete (1:1). Bột khô màu be được khuấy trong NH₃/MeOH 7N (480ml; 3,36 mol) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong bom bằng thép trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm. iPr₂O được bổ sung vào phần còn lại và chất rắn được lọc. Dịch lọc được làm bay hơi đến khô và chất thô được tinh chế bằng LC điều chế

trên (SiOH không đều 20-45 μ m 1000g DAVISIL). Pha động (0,5% NH₄OH, 94% DCM, 6% MeOH). Phân đoạn tinh khiết được thu lấy và được làm bay hơi để tạo ra 4,9g hợp chất trung gian J-1a dưới dạng dầu màu nâu (hiệu suất 65%).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 8,60 (br. s., 1H), 7,58 (s, 1H), 6,76 (s, 1H), 1,85 (m, 1H), 0,86 (m, 2H), 0,71 (m, 2H).

J-1a (4,84g; 44,8mmol) trong THF (60ml) được bổ sung từng giọt vào huyền phù của NaH (1,97g; 49,2mmol) trong THF (200ml) ở nhiệt độ 0°C dưới N₂. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút và SEM-Cl (9,9ml; 55,9mmol) trong THF (20ml) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng dưới N₂ trong thời gian 16 giờ. Nước được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng DCM. Lốp hữu cơ được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 20-45 μ m, 150g Merck, gradien pha động từ 50% DCM, 50% heptan đến 100% DCM). Các phân đoạn chứa hợp chất tinh khiết được kết hợp và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra 6,6g J-1b dưới dạng dầu màu vàng (62%).

Hỗn hợp của 2 chất đồng phân vùng: 70/30

Chất đồng phân vùng thứ yếu:

¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 7,64 (s, 1H), 6,56 (s, 1H), 5,34 (s, 1H), 3,45 (t, J = 8,08 Hz, 2H), 1,73-1,78 (m, 1H), 0,80-0,86 (m, 2H), 0,72-0,74 (m, 2H), 0,52-0,57 (m, 2H), -0,04 (s, 9H).

Chất đồng phân vùng chủ yếu:

¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 7,56 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 5,20 (s, 1H), 3,43 (t, J = 8,08 Hz, 2H), 1,73-1,78 (m, 1H), 0,80-0,86 (m, 2H), 0,72-0,74 (m, 2H), 0,56-0,62 (m, 2H), -0,04 (s, 9H).

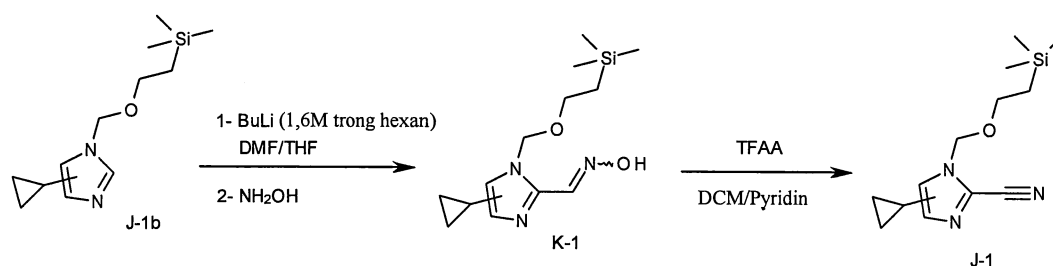
BrCN (6,11g; 57,7mmol) được bổ sung vào dung dịch của DMAP (7,05g; 57,7mmol) trong DMF (60ml) ở nhiệt độ 10°C. Phản ứng toả nhiệt đến nhiệt độ 35°C và chất kết tủa màu vàng nhạt được tạo thành. Hỗn hợp được làm nguội xuống 10°C và J-1b (5,5g; 23,1mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 6 giờ. Nước được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng Et₂O (2 lần). Các lớp hữu

cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm.

Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μm 220g Grace, pha động Heptan/DCM 50/50 đến 10/90) để tạo ra 2,2g J-1 không tinh khiết, mà được tinh chế thêm bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μm 90g Merck, pha động heptan/DCM 30/70) để tạo ra 0,94g của J-1 dưới dạng hỗn hợp của hai chất đồng phân vùng (hiệu suất 15%).

HPLC Rt (phút) = 6,11; MS M^+ (H^+): 264 (phương pháp V1004V1012)

Phương pháp tổng hợp thay thế của hợp chất trung gian J-1



BuLi (1,6M trong hexan) (11ml; 17,6mmol) được bổ sung vào dung dịch của J-1b (3,5g; 14,7mmol) trong THF (60ml) ở nhiệt độ -50°C . Hỗn hợp được khuấy ở cùng nhiệt độ trong thời gian 30 phút và DMF (1,7ml; 22mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được làm ấm lên từ từ đến RT trong 1 giờ và NH_2OH , HCl (970mg; 29,4mmol) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Nước được bổ sung và sản phẩm được chiết bằng DCM (3 lần), được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng MgSO_4 và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra 4,1g (hiệu suất định lượng) hỗn hợp của chất đồng phân K-1 dưới dạng dầu màu vàng.

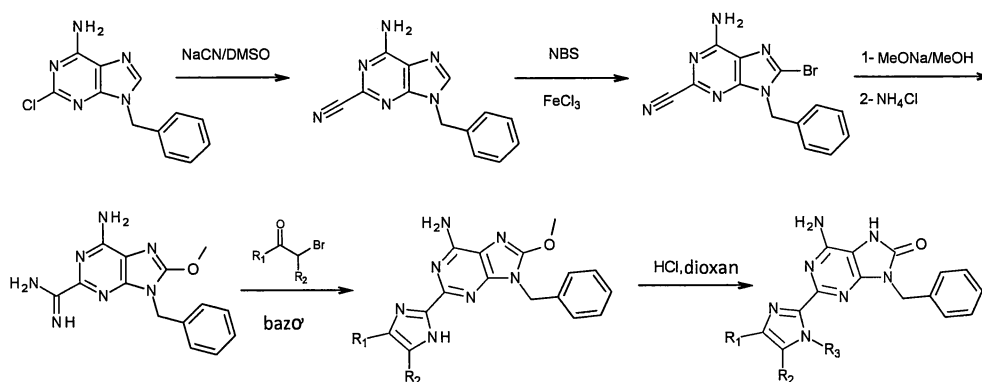
HPLC Rt (phút) = 5,30, 5,41 và 5,90; MS M^+ (H^+): 282 (phương pháp V2002V2002)

K-1 (3,1g; 11mmol) được hoà tan trong DCM (18ml) và pyridin (19ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được làm nguội xuống 0°C và TFAA (4,6ml; 33mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 24 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần còn lại được hoà tan trong AcOEt. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế

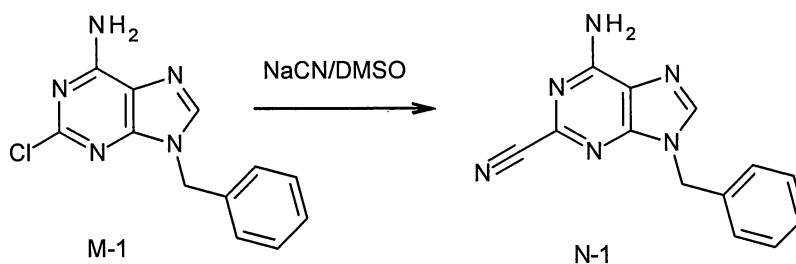
(SiOH không đều 15-40 μ m 90g Merck, pha động Heptan/DCM 30/70 đến DCM 100%) để tạo ra 2,14g hợp chất trung gian J-1 (73%) dưới dạng hỗn hợp của hai chất đồng phân.

HPLC Rt (phút) = 6,51; MS M⁺ (H⁺): 264 (phương pháp V2002V2002)

Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 3)



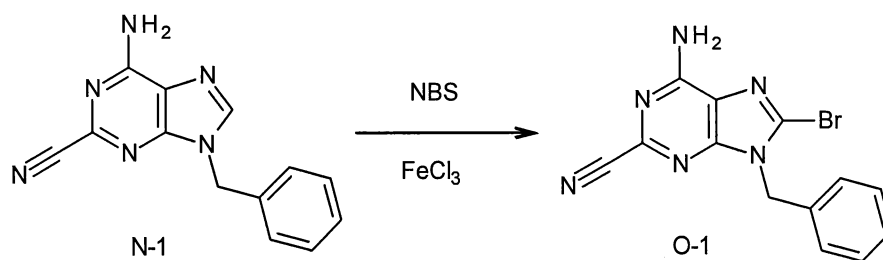
Tổng hợp hợp chất trung gian N-1



Trong lò vi sóng CEM, hỗn hợp của M-1 (phương pháp tổng hợp nó như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2006117670, các trang 57-58 “Điều chế 1-4” lần lượt để thu được 6-amino-9-benzyl-2-chloro-7,9-dihydro-purin-8-on) (9,7g, 37,351mmol), NaCN (3,11g, 63,50mmol) trong DMSO (100ml) được khuấy ở nhiệt độ 150°C trong thời gian 4 giờ. Hỗn hợp được rót vào nước và chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng nước và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 60°C để tạo ra 8,6g hợp chất trung gian N-1.

HPLC Rt (phút) = 5,23; MS M⁺ (H⁺): 251 (phương pháp V2003V2002)

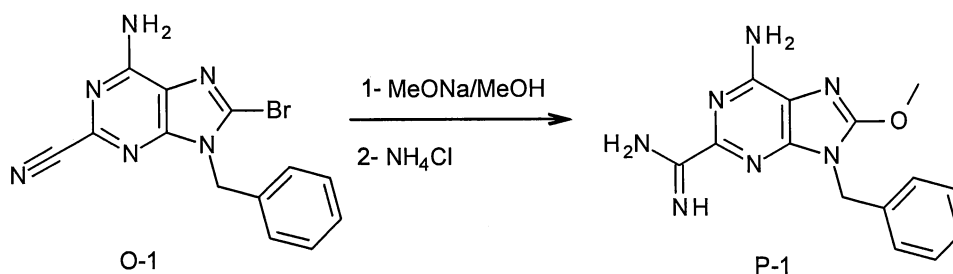
Tổng hợp hợp chất trung gian O-1



FeCl_3 (que trộn bột đầu) được bổ sung vào hỗn hợp của N-1 (3,70g, 147,84mmol) và NBS (26,2 g, 147,845mmol) trong CHCl_3 (60ml). Hỗn hợp được khuấy và được hồi lưu trong thời gian 3 giờ và sau đó được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Chất kết tủa được lọc ra. Dịch lọc được làm bay hơi và được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên gel silic oxit (15-40 μm , 120g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99-1) để tạo ra 4,5g hợp chất trung gian không tinh khiết O-1. Phân đoạn được hấp thụ CH_2Cl_2 và chất kết tủa được lọc ra để tạo ra 1,8g hợp chất trung gian O-1.

HPLC Rt (phút) = 5,77; MS M^+ (HCH_3CN^+): 370-372 (phương pháp V2003V2002)

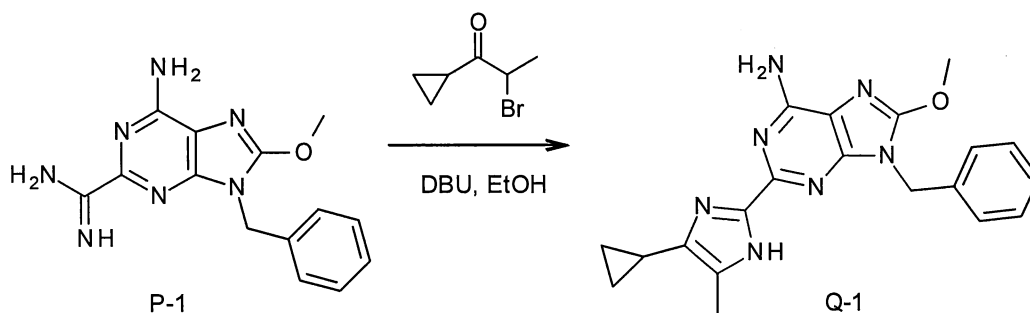
Tổng hợp hợp chất trung gian P-1



Hỗn hợp của O-1 (0,82g, 2,491mmol), MeONa/MeOH (dung dịch 30% theo khối lượng) (1,15ml, 6,228mmol) trong MeOH (15ml) được khuấy ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 2 giờ. NH_4Cl (333mg, 6,228mmol) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy và được hồi lưu trong thời gian 2 giờ. Dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên gel silic oxit (15-40 μm , 90g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$: 85-14-1). Các phân đoạn tinh khiết được thu lấy và được cô dưới áp suất giảm để tạo ra 0,55g hợp chất trung gian P-1 (hiệu suất 74%).

HPLC Rt (phút) = 4,46; MS M^+ (H^+): 298 (phương pháp V2003V2002)

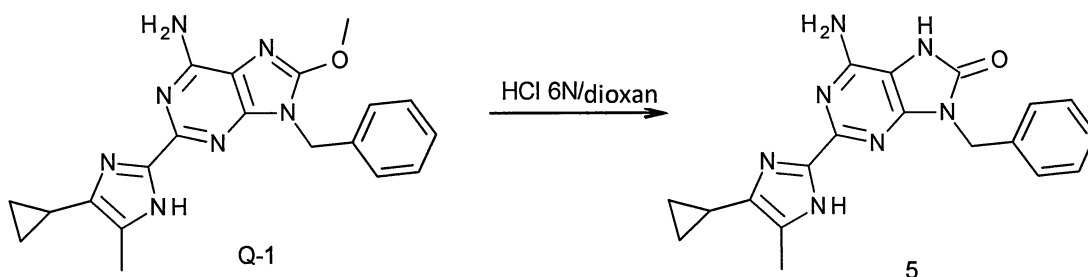
Tổng hợp hợp chất trung gian Q-1



2-bromo-1-cyclopropylpropan-1-on (104mg, 0,589mmol) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp của P-1 (175mg, 0,589mmol) và DBU (0,264ml, 1,766mmol) trong EtOH (5ml). Hỗn hợp được khuấy và được hồi lưu trong thời gian 5 giờ. Dung môi được cô dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh trên gel silic oxit (15-40 μ m, 40g, CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH: 95/5/0,1). Các phân đoạn tinh khiết được thu lấy và được cô dưới áp suất giảm để tạo ra 40mg hợp chất trung gian Q-1. Hợp chất thô được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

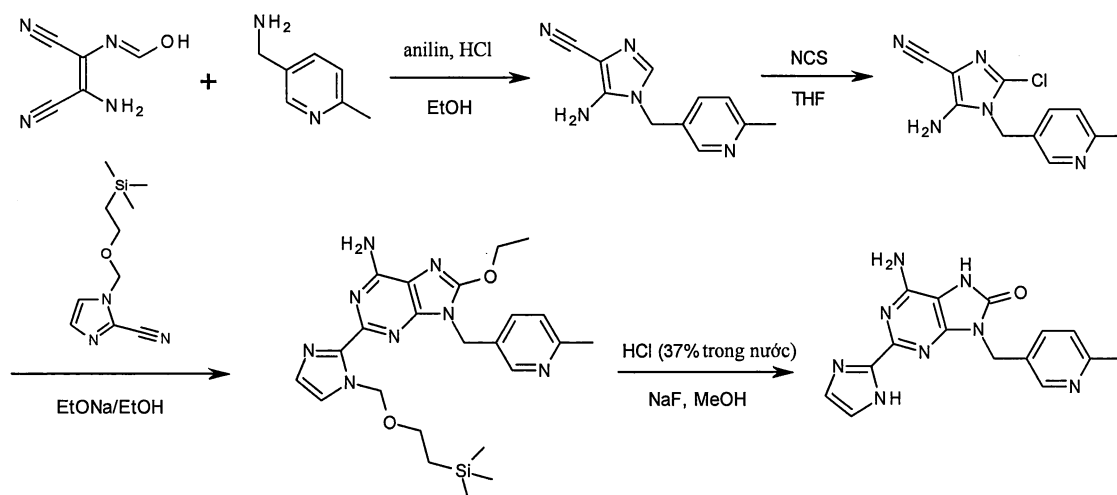
HPLC Rt (phút) = 5,35; MS M⁺ (H⁺): 376 (phương pháp V1005V1012)

Tổng hợp hợp chất cuối cùng 5

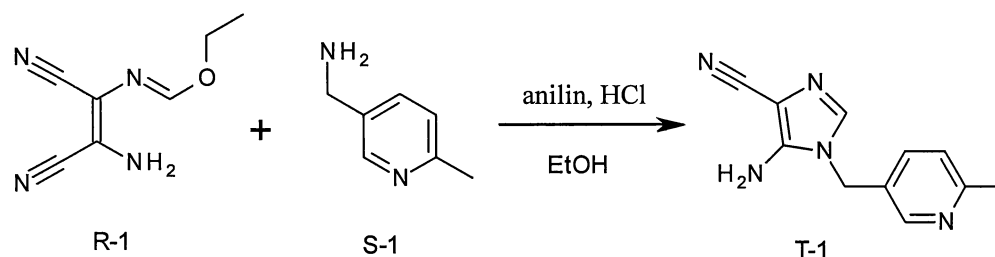


Hỗn hợp của Q-1 (40mg, 0,107mmol) trong HCl 6N (1ml) và dioxan (1ml) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 6 giờ. Hỗn hợp được làm bay hơi một nửa dưới áp suất giảm. Dung dịch được làm nguội xuống đến nhiệt độ 0°C, được bazơ hoá bằng NaHCO₃ và được chiết bằng EtOAc-CH₃OH (90-10). Các lớp hữu cơ liên kết được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng sắc ký nhanh trên gel silic oxit (15-40 μ m, 10g, CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH:88-12-0,5). Các phân đoạn tinh khiết được thu lấy và được cô dưới áp suất giảm. Chất rắn thu được (35mg) được kết tinh từ Et₂O để thu được 25mg hợp chất 5 (hiệu suất 64%, MP > 260°C).

Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 4)



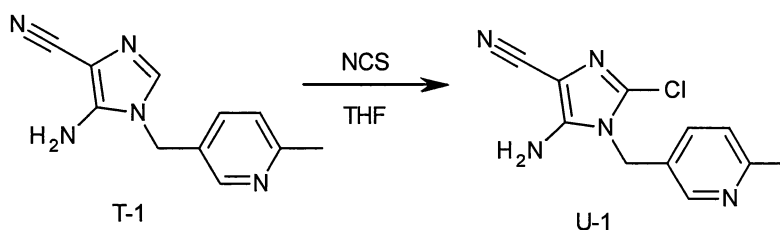
Tổng hợp hợp chất trung gian T-1



S-1 (phương pháp tổng hợp được mô tả trong tài liệu J. Med. Chem. 1996, 39, 13, 2586-2593) (1,14g; 9,33mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của R-1 (phương pháp tổng hợp được mô tả trong WO2006/117670) (1,46g; 8,89mmol) và anilin, HCl (18mg; 0,14mmol) trong EtOH (30ml) ở nhiệt độ 10°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ. Dung dịch trong nước của NaOH 3M (30ml) được bổ sung từng giọt vào dung dịch ở nhiệt độ 10°C và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Lớp nước được chiết bằng DCM (3 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch bão hoà trong nước của NaHCO₃, được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và được cô trong chân không để tạo ra 1,20g T-1 dưới dạng chất rắn màu nâu (hiệu suất 63%). T-1 được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

HPLC Rt (phút) = 4,45; MS M⁺ (H⁺): 214 (phương pháp V1010V1012)

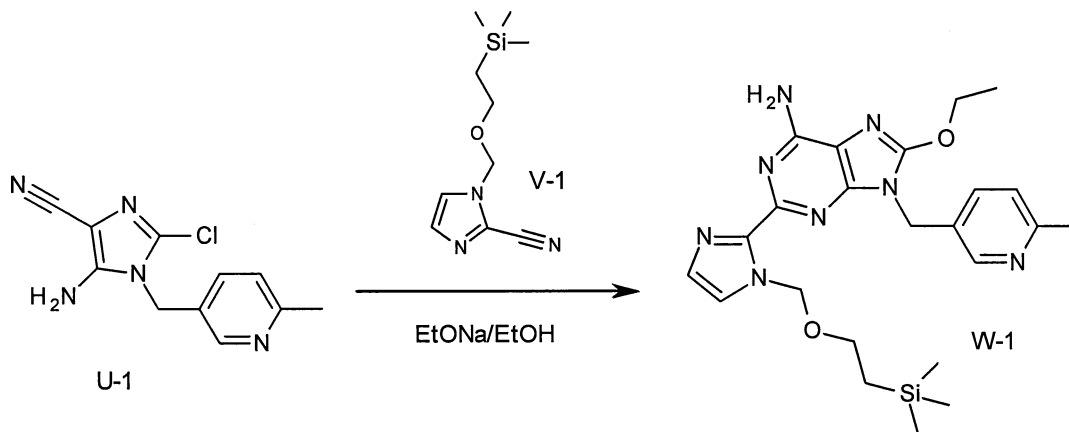
Tổng hợp hợp chất trung gian U-1



Dung dịch của NCS (475mg; 3,56mmol) trong THF (10ml) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của T-1 (690mg; 3,24mmol) trong THF (35ml). Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ dưới dòng N_2 . Dung dịch chứa NCS (260mg; 1,94mmol) trong THF (5ml) được bổ sung từng giọt vào dung dịch. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ dưới dòng khí N_2 . Hỗn hợp được hấp thụ với DCM, được rửa bằng dung dịch bão hoà trong nước của NaHCO_3 , được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và được làm bay hơi trong chân không để tạo ra 950mg chất rắn màu nâu. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μm , 40g Grace, mẫu lỏng, pha động: 98% DCM, 2% MeOH đến 90% DCM, 10% MeOH). Các phân đoạn chứa hợp chất tinh khiết được kết hợp và dung môi được loại bỏ trong chân không để tạo ra 200mg U-1 dưới dạng chất rắn màu nâu (hiệu suất 25%).

HPLC Rt (phút) = 5,13; MS M^+ (H^+): 248-250 (phương pháp V2012V2002)

Tổng hợp hợp chất trung gian W-1

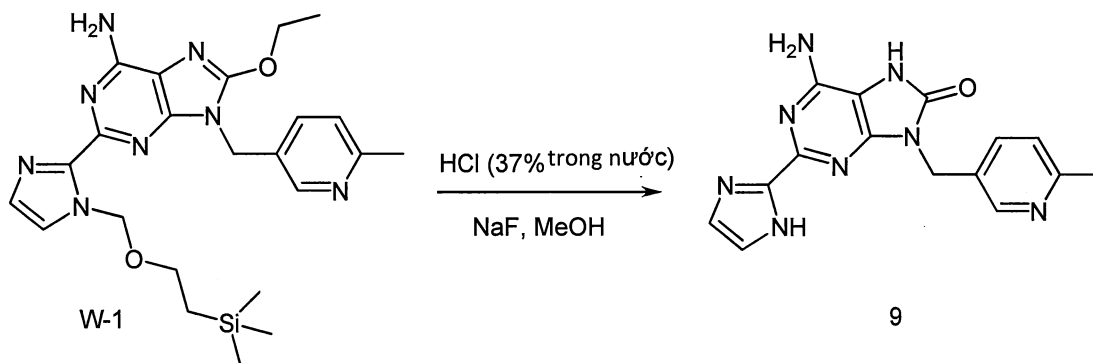


EtONa (398mg; 5,85mmol) được bổ sung vào dung dịch của U-1 (290mg; 1,17mmol) và V-1 (270mg; 1,21mmol) trong EtOH (15ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 16 giờ. Dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μm , 50g Merck, mẫu rắn, pha động

97/3/0,1). Phân đoạn chứa hợp chất tinh khiết được kết hợp và dung môi được loại bỏ để tạo ra 210mg W-1 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (hiệu suất 37%).

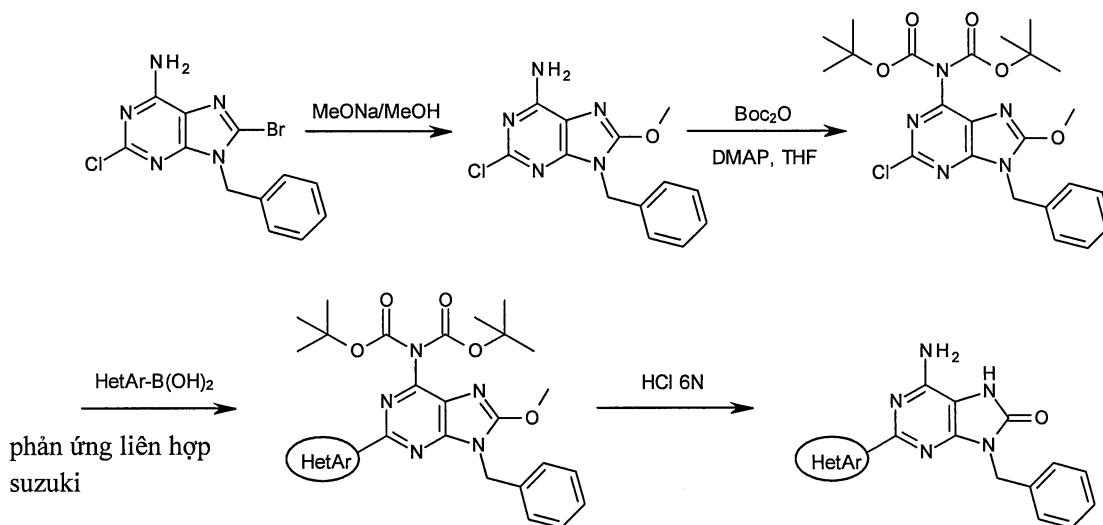
HPLC Rt (phút) = 6,68; MS M⁺ (H⁺): 248-250 (phương pháp V1010V1012)

Tổng hợp hợp chất 9

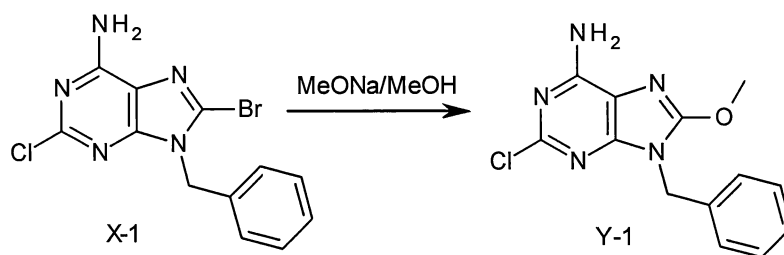


NaF (91mg; 2,18mmol) được bổ sung vào dung dịch của W-1 (210mg; 0,44mmol) trong HCl 37% trong nước (15ml) và MeOH (10ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và dung dịch trong nước 10% của K₂CO₃ được bổ sung đến khi độ pH có tính kiềm. Lọc nước được làm bão hòa bằng bột K₂CO₃ và sản phẩm được chiết bằng DCM/MeOH (95/5) (3 lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40μm, 10g Merck, pha động DCM/MeOH/NH₃ trong nước 93/3/0,1 đến 85/15/1). Các phân đoạn chứa hợp chất tinh khiết được kết hợp, dung môi được loại bỏ trong chân không và hợp chất nêu trong tiêu đề được làm khô trong chân không trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 60°C để tạo ra 9,8mg hợp chất 9 (6%) dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt. m.p. >260°C.

Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 5)



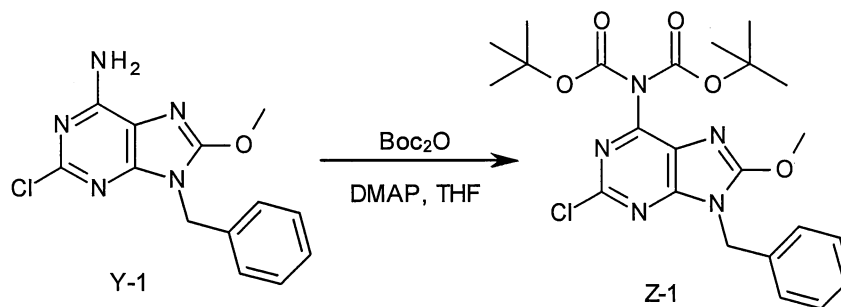
Tổng hợp hợp chất trung gian Y1



Natri metoxit (30% khối lượng trong MeOH) (15,6ml, 84,172mmol) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp của X1 (phương pháp tổng hợp được mô tả trong tài liệu Bioorg. Med. Chem., 11, 2003, 5501-5508) (5,7g, 16,834mmol) trong MeOH (150ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 6 giờ và sau đó được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô, để thu được 3,25g Y1. Hợp chất thô được sử dụng trong bước tiếp theo.

HPLC Rt (phút) = 5,53; MS M⁺ (H⁺): 290-292 (phương pháp V2003V2002)

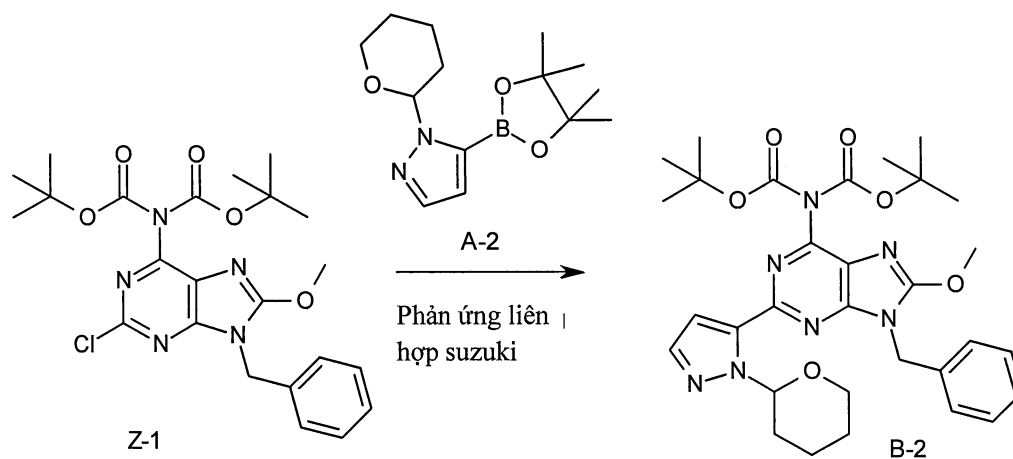
Tổng hợp hợp chất trung gian Z-1



Boc₂O (3,0g, 13,806mmol) được bổ sung dưới dòng N₂ vào hỗn hợp của Y-1 (1,0g, 3,452mmol), DMAP (42mg, 0,345mmol) trong THF (10ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 2 giờ. Hỗn hợp được rót vào nước và được chiết bằng EtOAc. Lốp hữu cơ được rửa bằng nước, được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và dung môi được làm bay hơi. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế trên (SiOH không đều 20-45μm 450g MATREX). Pha động (Gradient từ 98% DCM, 2% AcOEt đến 95% DCM, 5% AcOEt) để thu được 0,825g Z-1 (hiệu suất 49%, MP = 159°C).

HPLC Rt (phút) = 4,43; MS M⁺ (H⁺): 490-492 (phương pháp V2015V2007)

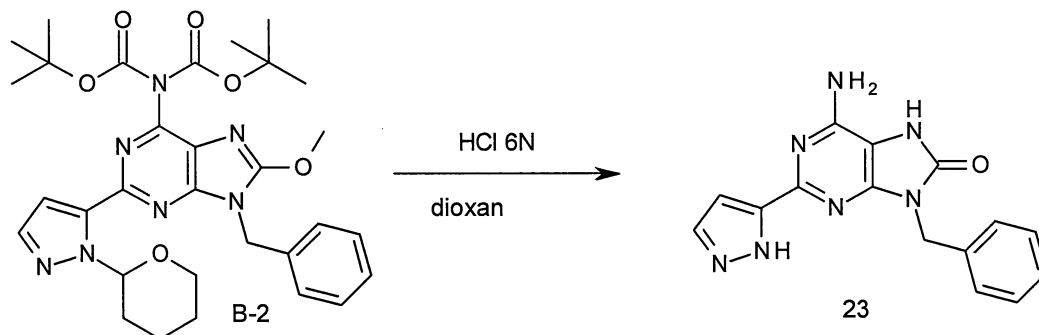
Tổng hợp hợp chất trung gian B-2



Dung dịch của Z-1 (300mg, 0,612mmol), A-2 (255mg, 0,918mmol) và NaHCO₃ (257mg, 3,06mmol) trong dioxan/nước (4/1) (3ml) được loại khí bằng bong bóng N₂ trong thời gian 10 phút. Tetrakis-(triphenylphosphin)-paladi (142mg,

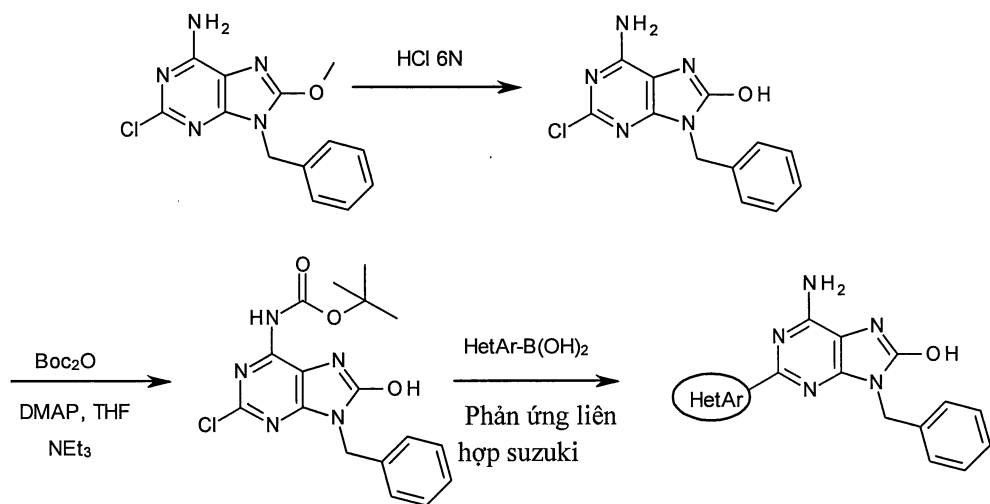
0,122mmol) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 5 giờ. Nước và EtOAc được bổ sung và các lớp được gạn. Lớp nước được chiết bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất cuối cùng 23

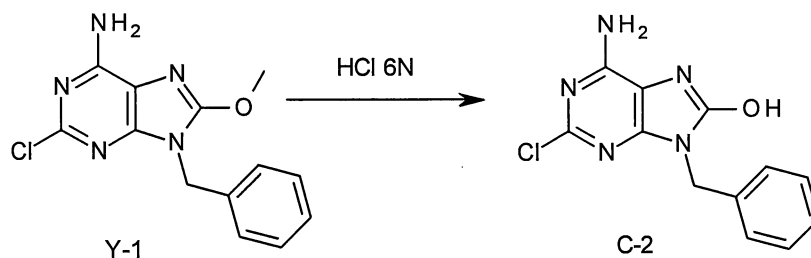


HCl 6N (10ml) được bổ sung vào dung dịch của B-2 (0,7g, 1,15mmol) trong dioxan (7ml) ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 12 giờ và sau đó được làm nguội xuống 0°C và được bazơ hoá bằng K_2CO_3 . Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc+ CH_3OH (90-10). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi. Chất thô được tinh chế bằng phương pháp LC điều chế (silic oxit ổn định 5 μm 150x30,0mm). Pha động (Gradient từ 0,3% NH_4OH , 97% DCM, 3% MeOH đến 1,4% NH_4OH , 86% DCM, 14% MeOH), để thu được 67mg hợp chất cuối cùng 23 sau khi kết tinh từ CH_3OH (hiệu suất 19%).

Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 6)



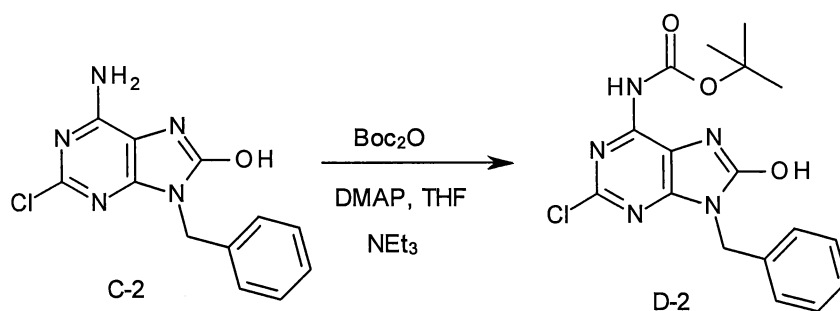
Tổng hợp hợp chất trung gian C-2



Hỗn hợp của Y-1 (0,53g, 1,829mmol) trong HCl 6N (5ml) và dioxan (5ml) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 18 giờ. Chất kết tủa được lọc ra, được rửa bằng lượng tối thiểu dioxan lạnh và được làm khô để thu được 0,28g chất thô C-2, mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

HPLC Rt (phút) = 4,96; MS M^+ (H^+): 276-278 (phương pháp V2003V2002)

Tổng hợp hợp chất trung gian D-2

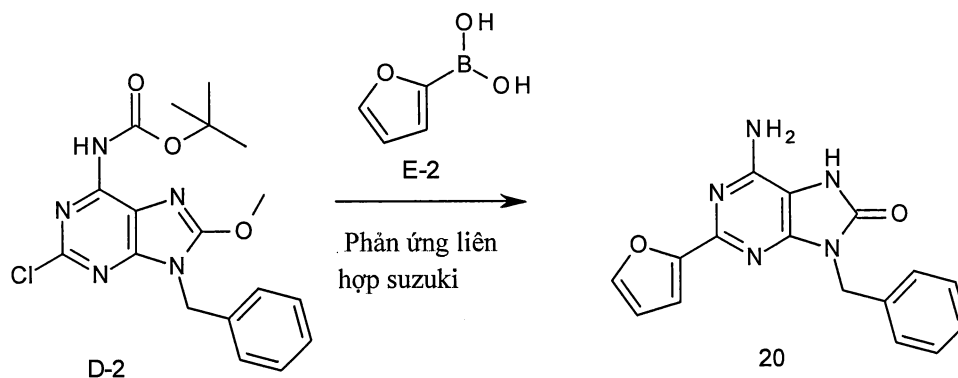


NEt_3 (0,187ml, 1,345mmol) và sau đó Boc_2O (0,215g, 0,987mmol) được bổ sung vào hỗn hợp của C-2 (0,28g, 0,897mmol) và DMAP (11mg, 0,0897mmol) trong

THF (3ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 2 giờ. Nước và EtOAc được bổ sung. Các lớp được gạn. Lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi để thu được 0,18g hợp chất trung gian D-2. Hợp chất thô được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

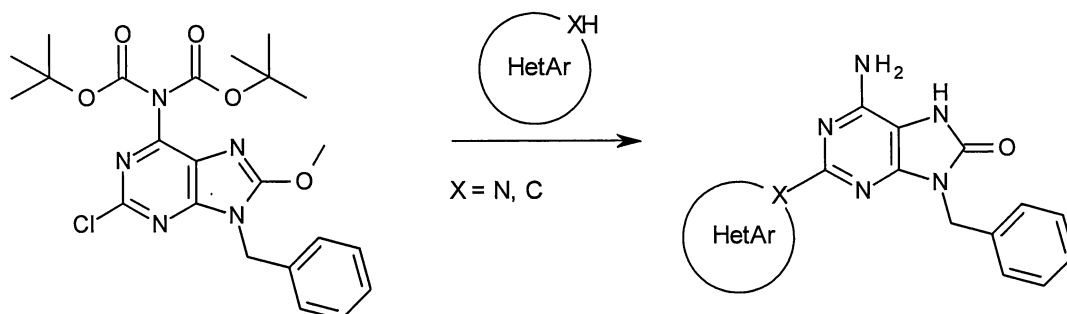
HPLC Rt (phút) = 6,31; MS M^+ (H^+): 376-378 (phương pháp V2002V2002)

Tổng hợp hợp chất cuối cùng 20

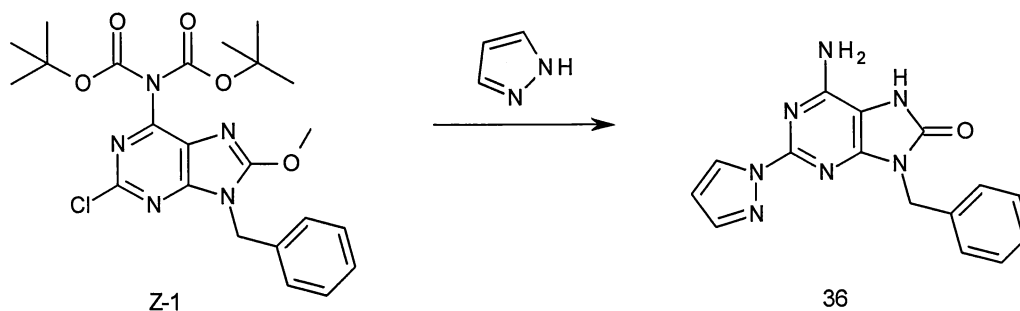


Dung dịch của D-2 (240mg, 0,64mmol), E-2 (107mg, 0,96mmol) và NaHCO_3 (269mg, 3,2mmol) trong dioxan/nước (4/1) (3,2ml) được loại khí bằng bong bóng N_2 trong thời gian 10 phút. Tetrakis-(triphenylphosphin)-paladi (148mg, 0,13mmol) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 16 giờ. Nước và EtOAc được bổ sung và các lớp được gạn. Lớp nước được chiết bằng EtOAc. Các lớp hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được làm bay hơi. Chất thô được tinh chế trên pha đảo để thu được 13mg hợp chất cuối cùng 20 (hiệu suất 6%).

Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 7)



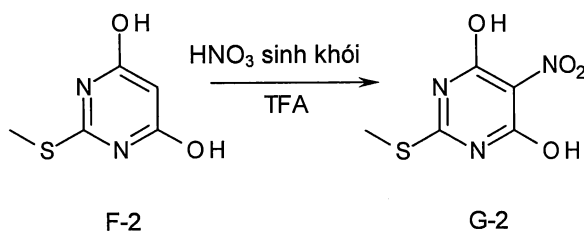
Tổng hợp hợp chất cuối cùng 36



Hỗn hợp của Z-1 (300mg, 0,612mmol) và pyrazol (417mg, 6,123mmol) được khuấy ở nhiệt độ 180°C trong thời gian 1 giờ (vi sóng Biotage). Hợp chất thô được tinh chế bằng sắc ký trên cột silicagel (15-40 μ m, 25g) trong CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 96/4/0,5 để tạo ra, sau khi kết tinh trong diisopropylete và làm khô trong áp suất chân không ở nhiệt độ 80°C, 85mg hợp chất cuối cùng 36.

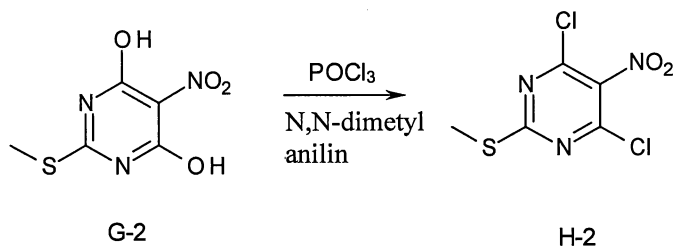
Sơ đồ chung của phương pháp điều chế sản phẩm cuối cùng (Phương pháp 8)

Tổng hợp hợp chất trung gian G-2



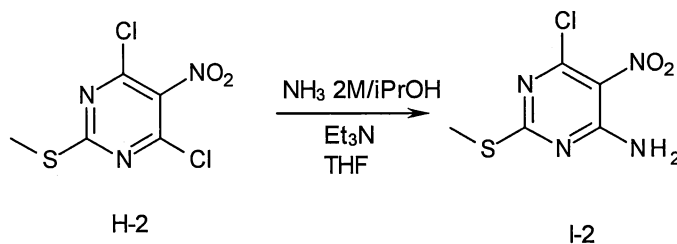
Dung dịch của F-2 (50g, 316,09mmol) trong TFA (210ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ 5°C sau đó HNO₃ sinh khói (19,5ml, 426,73mmol) được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ 5°C. Nhiệt độ được duy trì ở khoảng từ 10 đến 15°C trong quá trình bổ sung. Bể đá được tháo ra và khi nhiệt độ đạt đến 20°C, sự toả nhiệt mạnh xảy ra (từ 20°C lên 45°C trong 5 giây). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp được rót vào hỗn hợp của nước và đá. Chất kết tủa được lọc ra và được rửa bằng nước. Chất kết tủa được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 42g (hiệu suất 65%) hợp chất trung gian G-2. Hợp chất trung gian này được dùng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian H-2



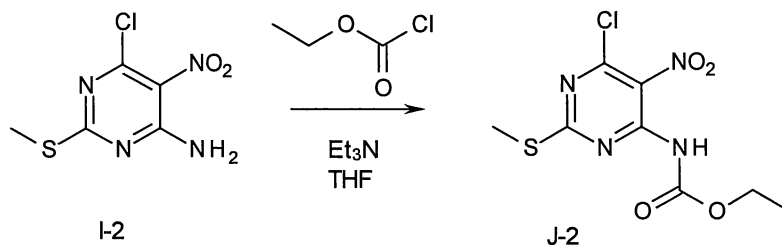
N,N-dimethylanilin (76,7ml, 0,61mol) được bổ sung từng giọt vào POCl_3 (93,7ml, 1,01mol) ở nhiệt độ 0°C . G-2 (41g, 201,79mmol) được bổ sung từng phần ở nhiệt độ 0°C , sau đó hỗn hợp được làm ấm lên 100°C trong thời gian 2 giờ. Dung dịch được cô trong chân không và POCl_3 dư được loại bỏ bằng cách làm bay hơi đồng sôi với toluen (3 lần). Dầu thu được được hấp thụ trong dung dịch CH_2Cl_2 -Heptan (70-30) và được lọc qua thiết bị lọc bằng thủy tinh bằng SiO_2 . Dịch lọc được cô và phần còn lại được tinh chế bằng LC điều chế trên (SiOH không đều 20-45 μm 1000g DAVISIL), pha động (80% Heptan, 20% CH_2Cl_2). Các phân đoạn tinh khiết được thu lấy và được cô để tạo ra 37,8g (hiệu suất 78%) hợp chất trung gian H-2.

Tổng hợp hợp chất trung gian I-2



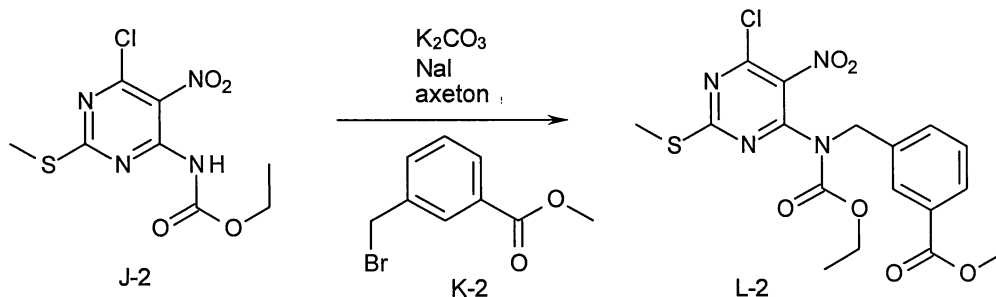
Dung dịch của NH_3 2M trong iPrOH (115ml, 229,31mmol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của H-2 (36,7g, 152,87mmol) và Et_3N (23,4ml, 168,16mmol) trong THF (360ml) (nhiệt độ được duy trì ở nhiệt độ trong phòng bằng bể nước đá trong quá trình bổ sung). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ. Hỗn hợp được làm bay hơi đến khô. Nước và EtOAc được bổ sung vào phần còn lại. Các lớp được tách ra và lớp nước được chiết bằng EtOAc (hai lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc, và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra 34,5g (hiệu suất 100%) hợp chất trung gian I-2.

Tổng hợp hợp chất trung gian J-2



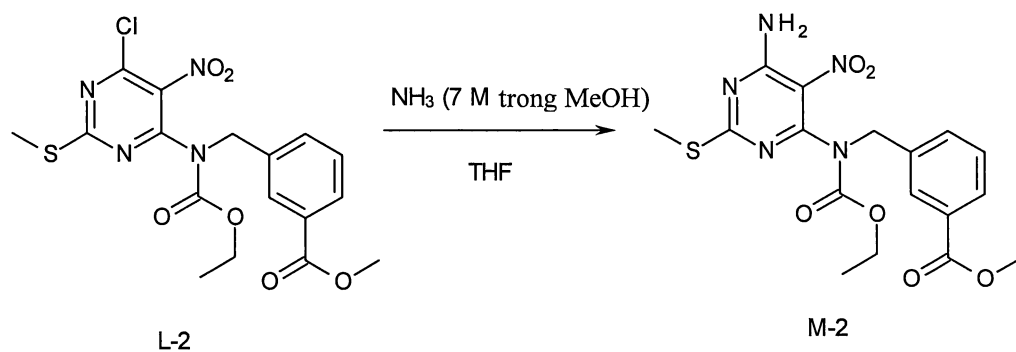
Etyl cloformat (13,5ml, 138,90mmol) được bổ sung vào dung dịch của I-2 (39,8g, 126,27mmol) và Et₃N (26,5ml, 189,40mmol) trong THF (1300ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 6 giờ và dung môi được làm bay hơi từng phần dưới áp suất giảm. Phần còn lại được hấp thụ trong CH₂Cl₂ và nước. Các lớp được tách ra; lớp nước được chiết bằng CH₂Cl₂ (hai lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm. Phần còn lại được tinh chế bằng LC điều chế trên (SiOH không đều 20-45μm 1000g DAVISIL), pha động (gradient từ 85% heptan, 15% AcOEt đến 80% heptan, 20% AcOEt). Các phân đoạn tinh khiết được thu lấy và được cô để tạo ra 35g (hiệu suất 95%) hợp chất trung gian J-2.

Tổng hợp hợp chất trung gian L-2



J-2 (5g, 17,0mmol), K-2 (3,91g, 17,0mmol), K₂CO₃ (5,90g, 42,7mmol) và NaI (2,56g, 17,0mmol) trong acetone (130ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Dung dịch được lọc và dịch lọc được làm bay hơi dưới áp suất giảm. Hợp chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40μm, 120g Merck, mẫu rắn, pha động: heptan/EtOAc 100/0 đến 80/20) để tạo ra hợp chất trung gian L-2 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (hiệu suất 69%).

Tổng hợp hợp chất trung gian M-2



Phản ứng được thực hiện theo hai mẻ gồm 2,7g L-2.

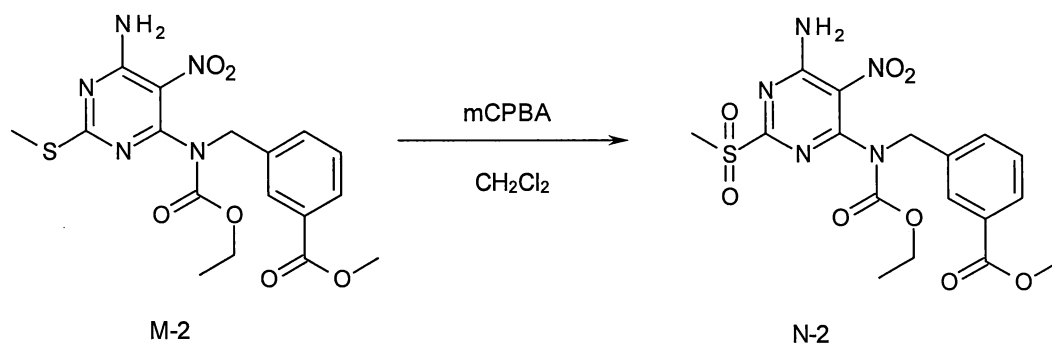
Dưới đây là quy trình dùng cho một mẻ 2,7 g:

Trong ống kín, L-2 (2,70g, 6,12mmol) được khuấy trong NH_3 (7M trong MeOH) (50ml) và THF (50ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ.

Hai mẻ được trộn lẫn.

Hỗn hợp được làm bay hơi trong chân không và phần còn lại được làm khô bằng cách chưng cất đồng sôi với EtOH (hai lần) để tạo ra chất rắn màu vàng. Nước và EtOAc được bổ sung, các lớp được tách ra và lớp nước được chiết bằng EtOAc (hai lần). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và được làm bay hơi trong chân không để tạo ra 4,9g hợp chất trung gian M-2 dưới dạng chất rắn màu vàng (hiệu suất 90%).

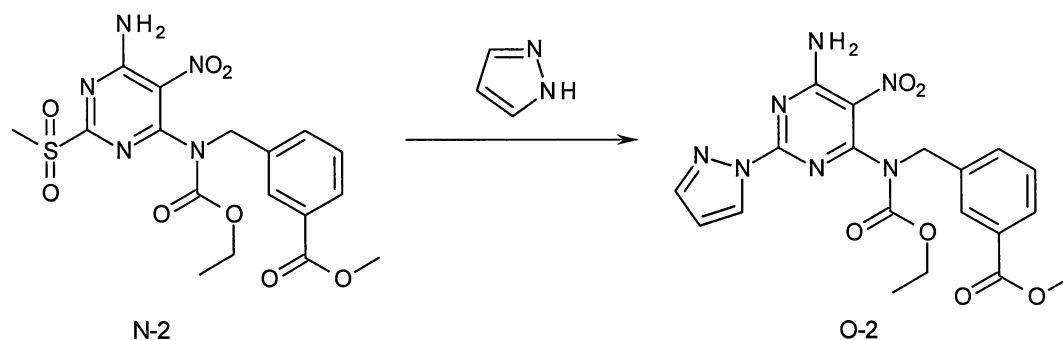
Tổng hợp hợp chất trung gian N-2



mCPBA (1,46g, 5,93mmol) được bổ sung từng phần vào dung dịch của M-2 (1g, 2,37mmol) trong CH_2Cl_2 (60ml) ở nhiệt độ 0°C . Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ. Dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ trong nước được bổ sung vào

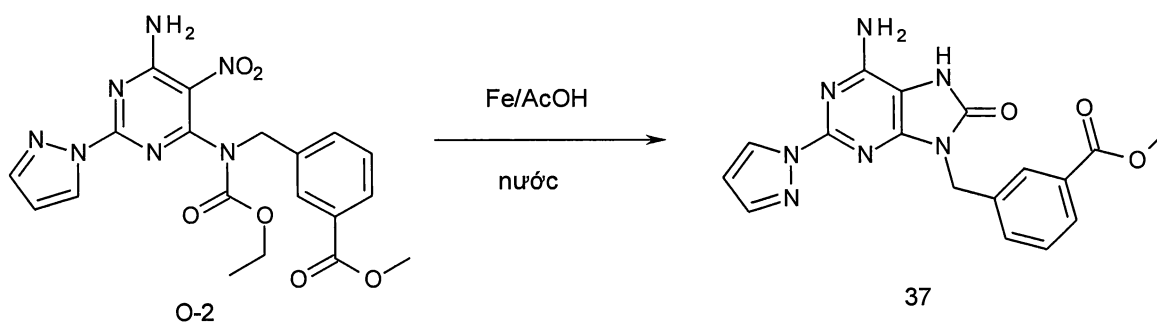
hỗn hợp. Các lớp được tách ra và lớp nước được chiết bằng CH_2Cl_2 (hai lần). Các lớp hữu cơ liên kết được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 bão hoà trong nước, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra 980mg hợp chất trung gian N-2 dưới dạng chất rắn màu vàng (hiệu suất 91%). Hợp chất trung gian N-2 được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Tổng hợp hợp chất trung gian O-2



Hỗn hợp của N-2 (500mg, 1,10mmol) và pyrazol (750mg, 11,0mmol) được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 45 phút. Hỗn hợp thu được được hấp thụ với EtOAc và dung dịch trong nước 1 M của HCl. Các lớp được tách ra, lớp hữu cơ được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và được làm khô trong chân không để tạo ra 550mg chất rắn màu vàng. Hợp chất thô được tinh chế bằng phương pháp LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μm , 25g Grace, mẫu rắn, gradient pha động: từ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ trong nước 97/3/0,03 đến 80/20/0,3) để tạo ra 370mg hợp chất trung gian O-2 dưới dạng chất rắn màu trắng (hiệu suất 76%).

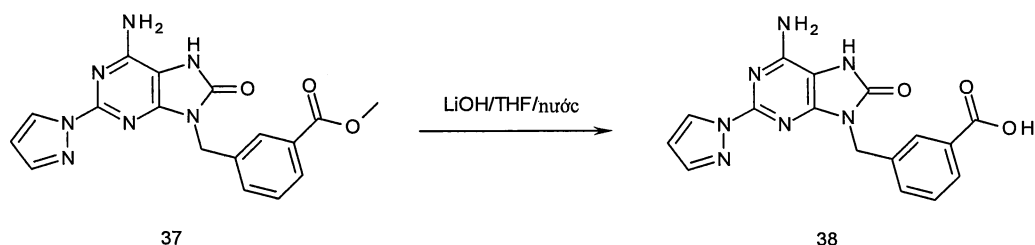
Tổng hợp hợp chất cuối cùng 37



Fe (280mg, 5,01mmol) được bổ sung vào hỗn hợp của O-2 (365mg, 827 μmol) trong AcOH (17ml) và nước (1,8ml). Hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ trong

phòng trong thời gian 64 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc trên miếng đệm xelit, được cô trong chân không và được làm đồng bay hơi với toluen (hai lần) để tạo ra chất dư tối màu. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μ m, 25g Merck, mẫu rắn, gradien pha động: từ CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ trong nước 96/4/0,4 đến 80/20/3) để tạo ra 250mg chất rắn màu trắng, mà được tinh chế lại bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μ m, 25g Merck, mẫu rắn, gradien pha động: từ CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ trong nước 96/4/0,4 đến 80/20/3) để tạo ra 110mg phân đoạn 1 dưới dạng chất rắn màu trắng (36%) và 25mg phân đoạn 2 dưới dạng chất rắn màu trắng (8%). Hiệu suất chung: 45%. 8mg phân đoạn 2 được làm khô trong chân không trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 40°C để tạo ra 6mg hợp chất cuối cùng 37 dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất cuối cùng 38



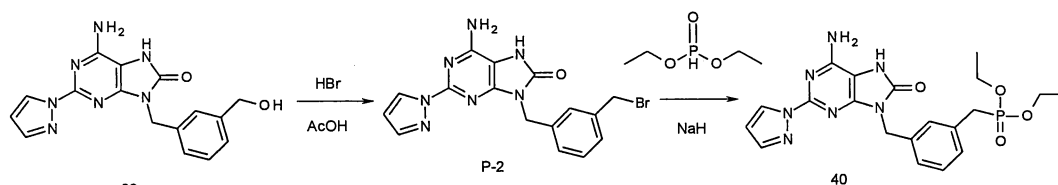
LiOH (9mg, 123 μ mol) được bổ sung vào huyền phù của 37 (15mg, 41,1 μ mol) trong THF (4ml) và nước (5ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Dung dịch trong nước 10% của K₂CO₃ được bổ sung đến khi độ pH có tính kiềm. Lọc nước được làm bão hoà bằng bột K₂CO₃ và sản phẩm được chiết bằng CH₂Cl₂/MeOH (9/1) (3 lần). Các lớp hữu cơ liên kết được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và dung môi được loại bỏ dưới áp suất giảm để tạo ra 200mg. Chất thô được tinh chế bằng phương pháp LC điều chế (X-Bridge-C18 5 μ m 30*150mm, pha động: gradien H₂O (0,1% axit formic)/MeCN 90/10 đến 0/100) để tạo ra 12mg hợp chất cuối cùng 38 dưới dạng chất rắn màu trắng (83%).

Tổng hợp hợp chất cuối cùng 39



Dibal-H (1,2M trong toluen) (0,2ml, 240 μ mol) được bổ sung từng giọt vào dung dịch của 37 (30mg, 82,1 μ mol) trong THF (3ml) và toluen (1ml) trong khí nitơ ở nhiệt độ 0°C. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 2 giờ. Dibal-H (0,2ml, 240 μ mol) được bổ sung và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Dung dịch bão hoà trong nước của kali natri tartrat được bổ sung vào làm trung hoà phản ứng. Hỗn hợp được pha loãng bằng EtOAc, sau đó khuấy mạnh trong thời gian 30 phút. Lớp hữu cơ được tách ra từ lớp nước, được rửa bằng nước muối, được làm khô bằng MgSO₄, được lọc và được cô trong chân không để tạo ra 40mg. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μ m, 4g Grace, mẫu rắn, gradien pha động: từ CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ trong nước 96/4/0,04 đến 80/20/2) để tạo ra chất rắn màu trắng. Chất rắn màu trắng thu được được làm khô trong chân không trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 40°C để tạo ra 8mg hợp chất cuối cùng 39 (29%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Tổng hợp hợp chất cuối cùng 40

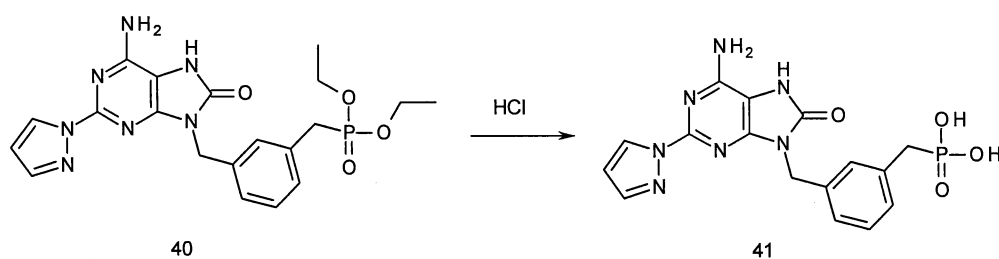


Hợp chất 39 (45mg, 133 μ mol) được hoà tan trong HBr (30% trong AcOH) (10ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Dung môi được làm bay hơi và AcOH được chưng cất đồng sôi với toluen (hai lần) để tạo ra 75mg hợp chất trung gian P-2 dưới dạng chất rắn màu nâu, mà được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bổ sung từng giọt diethyl phosphit (0,130ml, 1,33mmol) vào huyền phù của NaH (53mg, 1,33mmol) trong THF (4ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Bổ sung dung dịch của P-2 (64mg, 133

μmol) trong THF (4ml) vào hỗn hợp này. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Bổ sung từng giọt diethyl phosphit (0,130ml; 1,33mmol) vào huyền phù của NaH (53mg, 1,33mmol) trong THF (4ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp phản ứng thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Nước và EtOAc được bổ sung, các lớp được tách ra và lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch trong nước của NaHCO_3 và nước muối, được làm khô bằng MgSO_4 , được lọc và được cô trong chân không để tạo ra 75mg dầu trong. Chất thô được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều 15-40 μm , 25g Merck, tải khô, gradient pha động: từ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 đến 85/15) để tạo ra 38mg chất rắn màu trắng, mà được nghiền nhỏ trong pentan. Chất rắn thu được được lọc và được làm khô trong chân không trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 50°C để tạo ra 28mg hợp chất cuối cùng 40 dưới dạng chất rắn màu trắng (hiệu suất 40%).

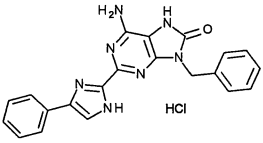
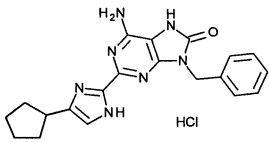
Tổng hợp hợp chất cuối cùng 41

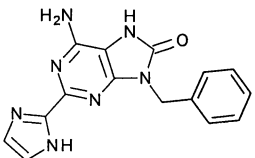
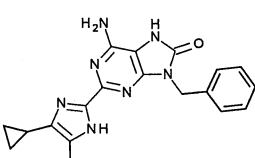
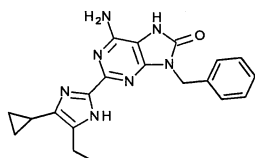


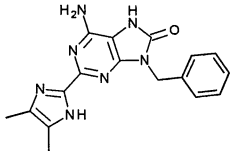
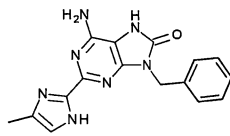
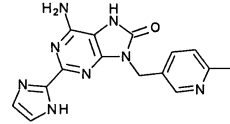
40 (590mg, 1,29mmol) được hoà tan trong HCl (37% trong nước) (60ml). Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 16 giờ. Dung môi được làm bay hơi và H_2O được chưng cất đồng sôi với EtOH (hai lần) để tạo ra 605mg hợp chất cuối cùng 41 dưới dạng chất rắn màu trắng (hiệu suất 100%).

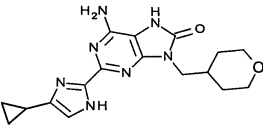
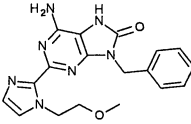
Bảng 1. Hợp chất có công thức (I)

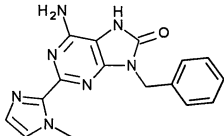
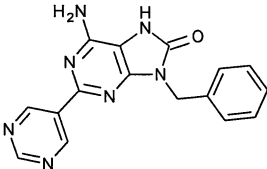
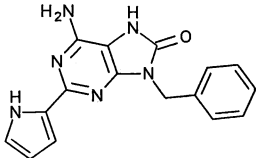
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
1		347,15	348	1,01, B	1,2		^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 0,84 (br. s., 2 H), 0,99 (d, $J=6,7$

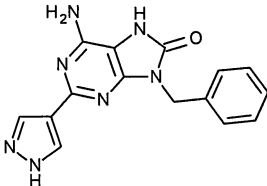
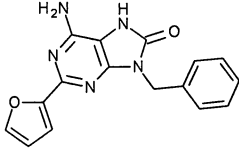
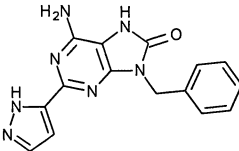
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							Hz, 2 H), 2,00 (br. s., 1 H), 3,16 (br. s., 1 H), 5,03 (br. s., 2 H), 7,08 - 7,21 (m, 2 H), 7,24 - 7,35 (m, 3 H), 7,36 - 7,45 (m, 3 H), 11,51 (br. s., 1 H)
2		383,15	384	1,18, B	1		¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 5,08 (s, 2 H), 7,04 (br. s., 2 H), 7,29 (m, <i>J</i> =7,3 Hz, 1 H), 7,34 (t, <i>J</i> =7,3 Hz, 2 H), 7,40 - 7,48 (m, 3 H), 7,49 - 7,56 (m, 2 H), 7,97 (d, <i>J</i> =7,3 Hz, 2 H), 8,20 (s, 1 H), 11,28 (s, 1 H)
3		375,18	376		1		¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400MHz): δ ppm 14,45 (br. s., 1H), 11,49 (s, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,41 (d, <i>J</i> =8 Hz, 2H), 7,31 (t, <i>J</i> =8 Hz, 2H), 7,28 (t, <i>J</i> =8 Hz, 1H),

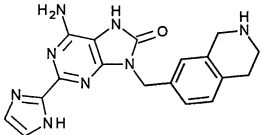
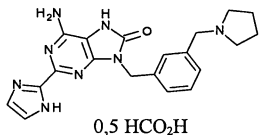
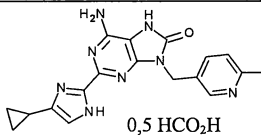
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							7,14 (br. s., 2H), 5,06 (s, 2H), 3,15 (m, 1H), 2,08-2,06 (m, 2H), 1,74-1,62 (m, 6H)
4		307,12	308	1,87, V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ ppm 12,34 (br. s., 1H), 10,32 (br. s., 1H), 7,22 - 7,44 (m, 5H), 7,18 (s, 1H), 7,01 (s, 1H), 6,48 (br. s., 2H), 5,00 (s, 2H)
5		361,16	362	2,35, V3018V3001	3	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11,89 (br. s., 1H), 10,24 (br. s., 1H), 7,21 - 7,40 (m, 5H), 6,51 (br. s., 2H), 5,01 (s, 2H), 2,24 (s, 3H), 1,72 - 1,80 (m, 1H), 0,65 - 0,78 (m, 4H)
6		375,18	376	2,52, V3018V3001	3	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11,85 (br. s., 1H), 10,26 (s, 1H), 7,21 - 7,39 (m, 5H), 6,51 (br. s.,

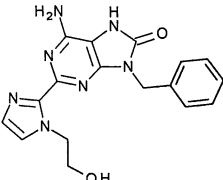
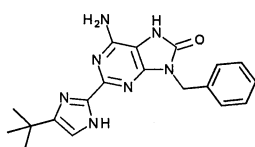
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							2H), 5,02 (s, 2H), 2,65 (m, 2H), 1,78 (br. s., 1H), 1,17 (t, $J=6,5$ Hz, 3H), 0,65-0,78 (m, 4H)
7		335,15	336	2,1, V3018V3001	3	230	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11,98 (br. s., 1H), 10,27 (s, 1H), 7,20 - 7,40 (m, 5H), 6,40 (s, 2H), 5,01 (s, 2H), 2,10 (br. s., 6H)
8		321,13	322	2,01, V3018V3001	3		¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 12,00 - 12,17 (m, 1H), 10,29 (s, 1H), 7,35 - 7,40 (m, 2H), 7,32 (t, $J=7,41$ Hz, 2H), 7,23 - 7,29 (m, 1H), 6,66 - 6,90 (m, 1H), 6,44 (br. s., 2H), 5,00 (br. s., 2H), 2,10 - 2,26 (m, 3H).
9		322,13	323	2,47, V3018V3001	4	> 260	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 10,38 (br. s., 1H), 8,56 (br. s., 1H), 7,71 (d, $J=7,07$ Hz, 1H),

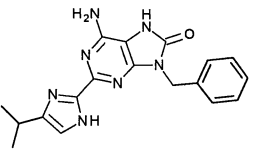
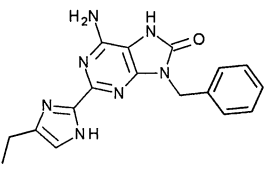
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							7,09 - 7,30 (m, 4H), 6,45 (br. s., 2H), 4,99 (s, 2H), 1,25 (br. s., 3H).
10		355,18	356	1,86, V3018V3001	4	> 260	¹ H NMR (500 MHz, MeOD) δ ppm 6,83 (s, 1H), 3,95 (dd, <i>J</i> = 2,84, 11,35 Hz, 2H), 3,87 (d, <i>J</i> = 7,57 Hz, 2H), 3,36 - 3,44 (m, 2H), 2,25 - 2,37 (m, 1H), 1,89 - 1,98 (m, 1H), 1,60 (dd, <i>J</i> = 1,89, 12,93 Hz, 2H), 1,41 - 1,52 (m, 2H), 0,88 - 0,96 (m, 2H), 0,71 - 0,77 (m, 2H).
11		365,16	366	2,11, V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10,47 (br. s., 1H), 7,22 - 7,38 (m, 5H), 7,20 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 6,62 (br. s., 2H), 4,97 (s, 2H), 4,52 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 2H), 3,48 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 2H), 3,10 (s, 3H)

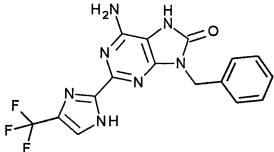
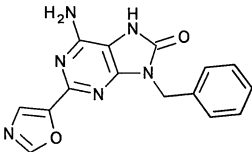
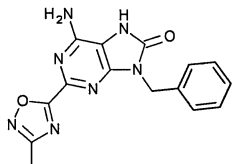
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	¹ H NMR
12		321,13	322	2,06, V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 7,16 - 7,33 (m, 5H), 7,10 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 6,24 (br. s., 2H), 4,91 (s, 2H), 3,85 (s, 3H)
15		319,12	320	2,3, Villa	6		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 10,25 (br.s, 1H), 9,47 (s, 2H), 9,23 (s, 1H), 7,40 (t, J=7,2Hz, 2H), 7,34 (t, J=7,2 Hz, 2H), 7,27 (d, J=7,2Hz, 1H) 6,70 (s, 2H), 5,75 (s, 1H), 5,02 (s, 2H)
18		306,12	307	2,45, Villa	6		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 11,10 (br. s., 1H), 10,20 (br. s., 1H), 7,43 (d, J=7,1Hz, 2H), 7,33 (t, J=7,1 Hz, 2H), 7,26 (t, J=7,1 Hz, 1H), 6,83 (d, J=1,5 Hz, 1H), 6,68 (br. s.,

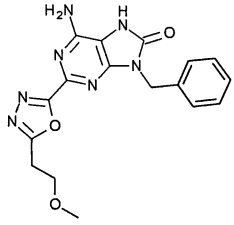
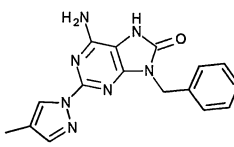
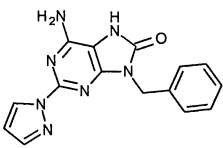
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							1H), 6,35 (s, 2H), 6,10 (d, $J=1,5$ Hz, 1H), 4,98 (s, 2H)
19		307,12	308	1,82, Villa	6		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 12,97 (br. s., 1H), 10,25 (br. s., 1H), 8,02 (br. s., 2H), 7,18 - 7,44 (m, 5H), 6,42 (s, 2H), 4,95 (s, 2H)
20		307,11	308	2,57, Villa	6		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300MHz): δ ppm 10,60 (br. s., 1H), 7,76 (br.s, 1H), 7,19 - 7,40 (m, 5H), 7,00 (d, $J=3,3$ Hz, 1H), 6,66 (s, 2H), 6,59 (dd, $J=3,3$, 1,8 Hz, 1H), 5,0 (s, 2H)
23		307,12	308	2,03, V3018V3001	5	> 260	¹ H NMR (500 MHz, DMSO-d ₆) δ ppm 12,84 - 13,37 (m, 1H), 10,30 (br. s., 1H), 7,23 - 7,76 (m, 6H), 6,70 (br. s., 1H), 6,49 (br. s., 2H), 4,98 (s,

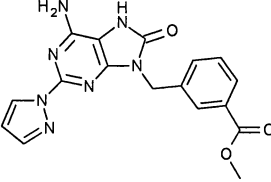
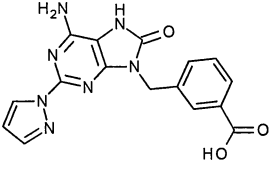
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							2H).
24	 0,5 HCO ₂ H	362,16	363	2,20 V3018V3001	4	240	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ ppm 12,25 (br. s., 1H), 7,18 (d, J=8,1 Hz, 1H), 6,99 - 7,14 (m, 4H), 6,50 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 3,93 (s, 2H), 3,01 - 3,07 (m, 2H), 2,72 (t, J=5,6 Hz, 2H)
25	 0,5 HCO ₂ H	390,19	391	2,47 V3018V3001	4	196	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ ppm 12,13 (br. s, 1H), 10,38 (br. s, 1H), 8,15 (br. s., 0,49 H, đỉnh muối format), 7,39 (br. s., 1H), 7,18 - 7,34 (m, 3H), 7,09 (br. s., 2H), 6,50 (br. s., 2H), 5,01 (br. s., 2H), 3,71 (br. s, 2H), 2,50 - 2,61 (m, 4H), 1,67 (br. s., 4H)
26	 0,5 HCO ₂ H	362,16	363	1,90 V3018V3001	4	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz) : δ ppm 12,05 (s br, 1H), 10,27 (s, 1H), 8,56 (d,

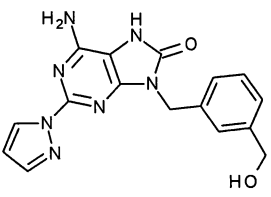
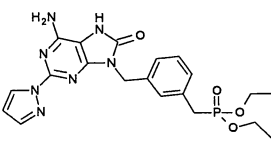
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							$J = 1,8$ Hz, 1H), 8,15 (s, 0,59H, đỉnh muối format), 7,70 (dd, $J = 8,2, 1,8$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,93 (s br, 1H), 6,49 (s br, 2H), 4,97 (s, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,78-1,90 (m, 1H), 0,70-0,87 (m, 2H), 0,64-0,70 (m, 2H)
27		351,14	352	1,78 V3018V3001	2	260	^1H NMR (DMSO- d_6 , 500MHz): δ ppm 10,37 (s, 1H), 7,23 - 7,38 (m, 5H), 7,21 (d, $J=0,9$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J=0,9$ Hz, 1H), 6,58 (br. s., 2H), 4,96 (s, 2H), 4,81 (t, $J=5,7$ Hz, 1H), 4,41 (t, $J=5,7$ Hz, 2H), 3,59 (q, $J=5,7$ Hz, 2H)
28		363,18	364	2,51 V3018V3001	2	> 260	^1H NMR (DMSO- d_6 , 500MHz): δ ppm 11,78 - 12,24 (m, 1H),

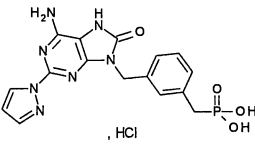
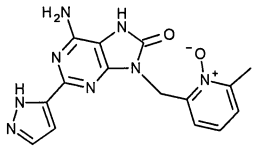
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							10,28 (s, 1H), 7,07 - 7,47 (m, 5H), 6,21 - 6,93 (m, 3H), 5,01 (s, 2H), 1,13 - 1,45 (m, 9H)
29		349,17	350	2,35 V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11,80 - 12,14 (m, 1H), 10,41 (br. s., 1H), 7,06 - 7,70 (m, 5H), 6,65 - 6,89 (m, 1H), 6,37 - 6,62 (m, 2H), 4,89 - 5,21 (m, 2H), 2,73 - 3,16 (m, 1H), 1,04 - 1,31 (m, 6H)
30		335,15	336	2,18 V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 11,82 - 12,28 (m, 1H), 10,47 (br. s., 1H), 7,08 - 7,56 (m, 5H), 6,63 - 7,01 (m, 1H), 6,38 - 6,59 (m, 2H), 4,78 - 5,07 (m, 2H), 2,53 - 2,69 (m, 2H), 0,95 - 1,35 (m, 3H)

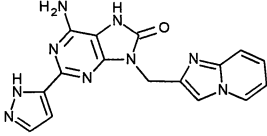
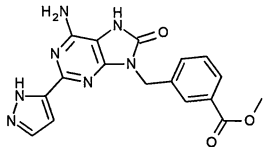
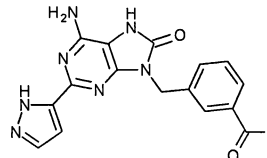
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
31		375,11	376	2,38 V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 13,07 (br. s., 1H), 10,46 (br. s., 1H), 7,83 (s, 1H), 7,39 (d, J=8,2Hz, 2H), 7,32 (t, J=8,2Hz, 2H), 7,26 (t, J=8,2Hz, 1H), 6,65 (br. s., 2H), 4,98 (s, 2H)
32		308,10	309	2,06 V3018V3001	5		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10,44 (br. s., 1H), 8,45 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,16 - 7,37 (m, 5H), 6,70 (br. s., 2H), 4,96 (s, 2H)
33		323,11	324	2,23 V3018V3001	5	> 250	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10,72 (br. s., 1H), 7,11 - 7,56 (m, 5H), 6,94 (br. s., 2H), 5,00 (br. s., 2H), 2,41 (s, 3H)

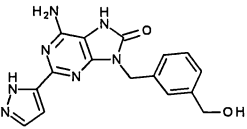
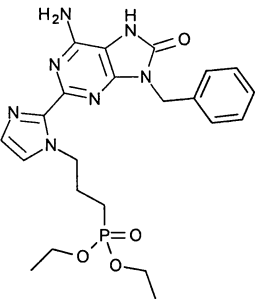
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
34		367,14	368	2,27 V3018V3001	5	> 250	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10,71 (br. s., 1H), 7,16 - 7,49 (m, 5H), 6,96 (br. s., 2H), 5,01 (s, 2H), 3,72 (t, J=6,3Hz, 2H), 3,24 (s, 3H), 3,01 (t, J=6,3Hz, 2H)
35		321,13	322	2,42 V3018V3001	7	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10,31 (br. s., 1H), 8,24 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,18 - 7,40 (m, 5H), 6,78 (br. s., 2H), 4,96 (s, 2H), 2,08 (s, 3H)
36		307,12	308	2,25 V3018V3001	7	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ ppm 10,33 (br. s., 1H), 8,46 (d, J=2,5Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,20 - 7,40 (m, 5H), 6,82 (br. s., 2H), 6,48 (d, J=3,8Hz, 1H), 4,97 (s, 2H)

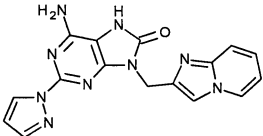
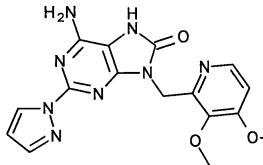
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
37		365,12	366	2,24 V3018V3001	8		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 9,80 (br. s., 1H), 8,47 (d, J=2,5Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,87 (d, J=7,6Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,65 (d, J=7,6Hz, 1H), 7,50 (t, J=7,6Hz, 1H), 6,84 (br. s, 2H), 6,43 - 6,63 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 3,83 (s, 3H)
38		351,11	352	2,27 V3014V3001	8	332	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 13,01 (br. s., 1H), 10,46 (br. s., 1H), 8,47 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,84 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,60 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,46 (t, J=7,6 Hz, 1H), 6,87 (br. s., 2H), 6,48 (s, 1H), 5,03 (s,

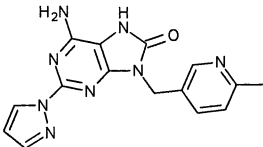
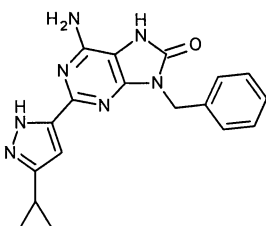
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							2H)
39		337,13	338	1,87 V3018V3001	8		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 10,28 (br. s., 1H), 8,46 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,10 - 7,37 (m, 4H), 6,82 (br. s., 2H), 6,35 - 6,57 (m, 1H), 5,17 (t, J=5,7Hz, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,45 (d, J=5,7Hz, 2H)
40		457,16	458	2,13 V3018V3001	8	218	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 10,41 (br. s., 1H), 8,46 (br. s., 1H), 7,69 (s, 1H), 7,04 - 7,38 (m, 4H), 6,85 (br. s., 2H), 6,47 (br. s., 1H), 4,95 (br. s., 2H), 3,85 (quin, J=7,0Hz, 4H), 3,18 (d, J=21,4 Hz, 2H), 1,06 (t,

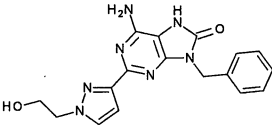
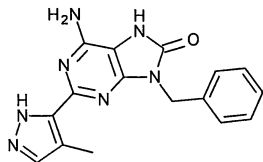
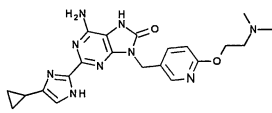
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							$J=7,0\text{Hz}$, 6H)
41		401,10	402	5,40 V2012V2002	8	101	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) 10,43 (s, 1H), 8,46 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,10 - 7,31 (m, 4H), 6,84 (br. s., 2H), 6,47 (dd, $J=2,5$, 1,5 Hz, 1H), 6,29 (br.s, 2H), 4,90 (s, 2H), 2,92 (d, $J=21,2$ Hz, 2H)
42		338,12	339	2,45 V3014V3001	7		^1H NMR (DMSO- d_6 , 500MHz): δ (ppm) 10,20 (br. s., 1H), 8,37 (d, $J=2,2$ Hz, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,48 (d, $J=6,9$ Hz, 1H), 7,19 (t, $J=6,9$ Hz, 1H), 6,82 - 7,00 (m, 3H), 6,44 (dd, $J=2,4$, 1,7 Hz, 1H), 4,95 - 5,14 (m, 2H), 2,43 (s, 3H)

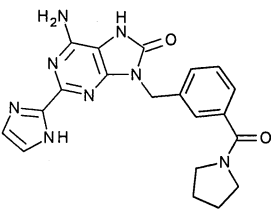
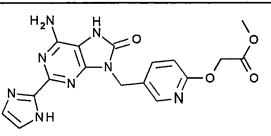
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
43		347,12	348	2,54 V3014V3001	7		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 12,48 - 13,42 (m, 1H), 9,90 - 10,57 (m, 1H), 8,44 (d, J=9,1 Hz, 1H), 7,37 - 7,99 (m, 3H), 7,19 (t, J=9,1 Hz, 1H), 6,83 (t, J=9,1 Hz, 1H), 6,69 (br. s., 1H), 6,47 (br. s., 2H), 5,12 (br. s., 2H)
44		365,12	366	3,05 V3014V3001	7		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 12,32 - 13,87 (m, 1H), 9,94 - 10,53 (m, 1H), 7,4 - 8,26 (m, 5H), 6,61 - 6,89 (m, 1H), 6,28 - 6,59 (m, 2H), 5,05 (s, 2H), 3,83 (s, 3H)
45		351,11	352	2,13 V3014V3001	7		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 13,06 (br. s., 2H),

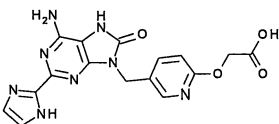
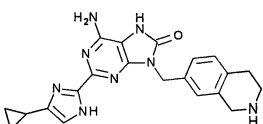
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							10,32 (br. s., 1H), 7,97 (s, 1H), 7,83 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 7,69 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 7,57 (br. s., 1H), 7,46 (t, $J=7,6$ Hz, 1H), 6,72 (d, $J=1,5$ Hz, 1H), 6,48 (s, 2H), 5,04 (s, 2H)
46		337,13	338	1,63 V3018V3001	7	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12,48 - 13,52 (m, 1H), 9,83 - 10,74 (m, 1H), 7,01 - 7,98 (m, 5H), 6,22 - 6,84 (m, 3H), 5,17 (t, $J=5,7$ Hz, 1H), 4,97 (s, 2H), 4,44 (d, $J=5,7$ Hz, 2H)
47		485,19	486	2,11 V3018V3001	2		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 10,45 (s, 1H), 7,13 - 7,54 (m, 6H), 6,94 (s, 1H), 6,62 (br. s., 2H), 4,98 (s, 2H),

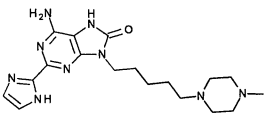
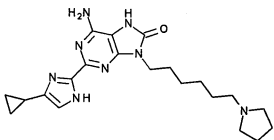
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							4,33 - 4,48 (m, 2H), 3,82 - 4,02 (m, 4H), 1,76 - 1,92 (m, 2H), 1,47 - 1,66 (m, 2H), 1,15 (t, $J=6,8$ Hz, 6H)
48		347,12	348	1,81 V3018V3001	8		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 10,35 (br. s., 1H), 8,27 - 8,53 (m, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,47 (d, $J=9,1$ Hz, 1H), 7,15 - 7,27 (m, 1H), 6,76 - 6,88 (m, 3H), 6,36 - 6,53 (m, 1H), 5,09 (s, 2H)
49		368,13	369	1,94 V3018V3001	8	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 9,42 - 10,55 (m, 1H), 8,35 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J=5,4$ Hz, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,02 (d, $J=5,4$ Hz, 1H), 6,80 (br. s., 2H), 6,36 - 6,55

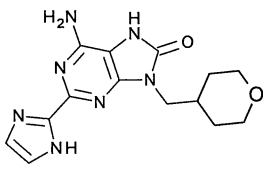
#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							(m, 1H), 5,07 (s, 2H), 3,81 - 3,96 (m, 6H)
50		322,13	323	2,78 V3014V300 1	8	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 10,31 (br. s., 1H), 8,49 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,65 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,21 (d, J=7,6 Hz, 1H), 6,82 (br. s., 2H), 6,50 (br. s., 1H), 4,95 (s, 2H), 2,39 (s, 3H)
51		347,15	348	2,35 V3018V3001	7	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12,36 - 12,99 (m, 1H), 10,33 (br. s., 1H), 6,94 - 7,75 (m, 5H), 5,99 - 6,73 (m, 3H), 4,97 (s, 2H), 1,81 - 1,97 (m, 1H), 0,54 - 1,02 (m, 4H)

#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
52		351,14	352	1,93 V3018V3001	7		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 10,23 (br. s., 1H), 7,68 (d, <i>J</i> =2,0 Hz, 1H), 7,15 - 7,40 (m, 5H), 6,72 (d, <i>J</i> =2,0 Hz, 1H), 6,46 (s, 2H), 4,97 (s, 2H), 4,87 (t, <i>J</i> =5,1 Hz, 1H), 4,17 (t, <i>J</i> =5,1 Hz, 2H), 3,75 (q, <i>J</i> =5,1 Hz, 2H)
53		321,13	322	2,26 V3018V3001	7	192	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12,94 (br. s., 1H), 10,28 (s, 1H), 7,17 - 7,49 (m, 6H), 6,41 (br. s., 2H), 4,97 (s, 2H), 2,28 - 2,39 (m, 3H)
54		435,21	436	1,32 V3018V3001	2	211	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 11,90 - 12,42 (m, 1H), 10,14 (br. s., 1H), 7,85 - 8,01

#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							(m, 1H), 7,35 - 7,56 (m, 1H), 6,21 - 7,07 (m, 4H), 4,65 - 4,77 (m, 2H), 3,86 - 3,94 (m, 2H), 2,38 - 2,44 (m, 2H), 2,04 (s, 6H), 1,77 - 1,89 (m, 1H), 0,60 - 0,92 (m, 4H)
55		404,17	405	2,80 V3014V3001	2	218	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 12,52 (br. s., 1H), 10,32 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,46 - 7,51 (m, 1H), 7,34 - 7,45 (m, 2H), 7,12 (br. s., 2H), 6,49 (s, 2H), 4,94 - 5,25 (m, 2H), 3,41 (t, J=7,1 Hz, 2H), 3,20 - 3,29 (m, 2H), 1,79 (quin, J=7,1 Hz, 2H), 1,64 (quin, J=7,1 Hz, 2H)
57		396,13	397	1,79 V3018V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 12,47

#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							(br. s., 1H), 10,30 (br. s., 1H), 8,25 (br. s., 1H), 7,84 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 7,13 (br. s., 2H), 6,90 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 6,50 (br. s., 2H), 4,94 (br. s., 2H), 4,87 (br. s., 2H), 3,63 (s, 3H)
58		382,11	383	2,00 V3014V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 11,87 - 13,45 (m, 2H), 10,50 (br. s., 1H), 8,27 (br. s., 1H), 7,83 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 7,22 (br. s., 2H), 6,86 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 6,61 (br. s., 2H), 4,94 (br. s., 2H), 4,77 (br. s., 2H)
60		402,19	403	2,61 V3014V3001	2	242	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 8,98 - 12,14 (m, 1H), 8,21 (s, 1H),

#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							6,04 - 7,47 (m, 6H), 4,95 (br. s., 2H), 4,02 (br. s., 2H), 3,13 (br. s., 2H), 2,79 (br. s., 2H), 1,67 - 1,97 (m, 1H), 0,42 - 0,94 (m, 4H)
61		385,23	386	2,14 V3014V3001	2		¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 11,85 (br. s., 1H), 10,32 (s, 1H), 7,09 (s, 2H), 6,46 (s, 2H), 3,81 (t, <i>J</i> =7,2 Hz, 2H), 2,30 - 2,48 (m, 10H), 2,27 (s, 3H), 1,74 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 2H), 1,49 (quin, <i>J</i> =7,2 Hz, 2H), 1,20 - 1,36 (m, 2H)
62		410,25	411	1,67 V3018V3001	2	174	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz): δ (ppm) 11,91 (br. s., 1H),

#	CẤU TRÚC	Khối lượng chính xác	Khối lượng tìm thấy [M+H]	Thời gian LCMS Ret, Phương pháp	Phương pháp tổng hợp	MP (°C)	H NMR
							10,29 (br. s., 1H), 6,84 (br. s., 1H), 6,49 (br. s., 2H), 3,79 (t, $J=6,9$ Hz, 2H), 2,52 - 2,70 (m, 6H), 1,80 - 1,90 (m, 1H), 1,71 (br. s., 5H), 1,39 - 1,52 (m, 2H), 1,17 - 1,38 (m, 5H), 0,51 - 0,91 (m, 4H)
63		315,14	316	2,37 V3014V3001	2	> 260	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400MHz): δ (ppm) 12,35 (br. s., 1H), 10,24 (br. s., 1H), 7,11 (br. s., 2H), 6,44 (s, 2H), 3,78 - 3,87 (m, 2H), 3,70 (d, $J=7,1$ Hz, 2H), 3,24 (t, $J=10,9$ Hz, 2H), 1,99 - 2,18 (m, 1H), 1,08 - 1,76 (m, 4H)

Phương pháp phân tích.

Tất cả các hợp chất đều được đặc trưng bằng LC-MS. Phương pháp LC-MS sau đây được sử dụng:

Phương pháp VILLA:

Tất cả các phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng tứ cực LC/MSD dây Agilent 1100 được nối với hệ sắc ký lỏng dây Agilent 1100 (liquid chromatography - LC) bao gồm bơm nhệ nguyên có bộ khử khí, bộ lấy mẫu tự động, khoang cột ổn nhiệt và bộ dò dây điốt. Khối phổ kế (mass spectrometer - MS) được hoạt động bằng nguồn ion hoá phun điện tử áp lực khí quyển (atmospheric pressure electro-spray ionisation - API-ES) theo phương thức ion dương. Điện áp mao dẫn được đặt ở 3000 V, điện áp phân mảnh ở 70 V và nhiệt độ tứ cực được duy trì ở nhiệt độ 100°C. Dòng khí làm khô và giá trị nhiệt độ lần lượt là 12,0 L/phút và 350°C. Nitơ được sử dụng làm khí phun, ở áp suất $241,318.10^3$ Pa (35 psig). Việc thu dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm Agilent Chemstation.

Ngoài quy trình chung, việc phân tích được thực hiện trên cột YMC pack ODS-AQ C18 (dài 50mm x đường kính trong 4,6mm; hạt 3µm) ở nhiệt độ 35°C, với tốc độ dòng là 2,6ml/phút. Việc rửa giải bằng gradien được thực hiện từ 95% (nước + 0,1% axit formic) / 5% axetonitril đến 5% (nước + 0,1% axit formic) / 95% axetonitril trong thời gian 4,80 phút, sau đó hợp phần pha động cuối cùng được giữ trong thời gian 1,00 phút nữa. Thể tích bơm tiêu chuẩn là 2µl. Giới hạn tìm kiếm được đặt ở 190-400nm đối với bộ phát hiện UV-PDA và 100-1400 m/z đối với bộ phát hiện MS.

Phương pháp B Hệ ACQUITY UPLC với bộ phát hiện SQD

Pha động: A: metanol, B: 10mM amoni axetat trong 90% nước và 10% axetonitril

Cột: Kiểu cột: Cột Aquity UPLC BEH C18 1,7µm 2,1x50mm (Waters No 186002350), Nhiệt độ: 70°C. Thời gian biểu gradien. Tốc độ dòng chảy: 0,7ml/phút, Ngừng tìm kiếm: 1,8 phút. Thời gian dừng: 2 phút.

Thời gian(phút)	%A	%B	Tốc độ dòng chảy (ml/phút)
0,00	5	95	0,7
1,30	95	5	0,7
1,50	95	5	0,7
1,70	5	95	0,7
2,00	5	95	0,7

Thể tích bơm: 0,75 μ l. Kiểu bơm: Vòng một phần với kim bơm đầy tràn

Chiều dài bước sóng bắt đầu: 210 nm. Chiều dài bước sóng kết thúc: 400 nm.

Độ phân giải: 1,2 nm. Tốc độ lấy mẫu: 20 điểm/ giây

Phương pháp MS:

Hàm số 1: kiểu ion: ES+, Định dạng dữ liệu: Trọng tâm

Khối lượng bắt đầu: 160. Khối lượng kết thúc: 1000

Thời gian quét (giây): 0,1, Thời gian bắt đầu (phút): 0,0, Thời gian kết thúc (phút): 2,0, Điện áp hình nón (V): 30

Hàm số 2:

Kiểu ion: ES-, Định dạng dữ liệu: Trọng tâm, Khối lượng bắt đầu: 160, Khối lượng kết thúc: 1000

Thời gian quét (giây): 0,1, Thời gian bắt đầu (phút): 0,0, Thời gian kết thúc (phút): 2,0, Điện áp hình nón (V): 30, Dòng trong MS: 700 μ l/phút

Quy trình chung VDR1 (đối với các phương pháp V100xV10xx.olp và V200xV20xx.olp)

Phép đo HPLC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ Alliance HT 2795 (Waters) chứa bơm bốn thành phần có bộ khử khí, bộ lấy mẫu tự động, bộ phát hiện dãy điốt (diode - array detector - DAD) và cột như được xác định trong các phương pháp tương ứng dưới đây, cột được giữ ở nhiệt độ 30°C. Dòng từ cột được chia vào phổ kế MS. Bộ phát hiện MS được tạo cấu hình với nguồn ion hoá phun điện tử. Điện áp kim mao dẫn là 3 kV và nhiệt độ nguồn được duy trì ở nhiệt độ 100°C trên LCT (Khối phổ kế thời gian bay Zspray™ từ Waters - đối với các phương pháp V100xV10xx.olp), và 3,15 kV ở nhiệt độ 110°C trên ZQ™ (khối phổ kế tứ cực đơn Zspray™ từ Waters - đối với các phương pháp V200xV20xx.olp). Nitơ được sử dụng làm khí phun. Việc thu dữ liệu được thực hiện bằng hệ dữ liệu Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Quy trình chung VDR2 (đối với các phương pháp V300xV30xx.olp)

Phép đo LC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ UPLC (sắc ký lỏng cao áp) (Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC) Acquity (Waters) chứa bơm nhĩ nguyên có bộ khử khí, bộ lấy mẫu tự động, bộ phát hiện dãy điôt (diode - array detector - DAD) và cột nhữ được xác định trong các phương pháp tương ứng dưới đây, cột được giữ ở nhiệt độ 40°C. Dòng từ cột được đưa vào bộ phát hiện MS. Bộ phát hiện MS được tạo cấu hình với nguồn ion hoá phun điện tử. Điện áp kim mao dẫn là 3 kV và nhiệt độ nguồn được duy trì ở 130°C trên Quattro (khối phổ kế tứ cực ba phần từ Waters). Nitơ được sử dụng làm khí phun. Việc thu dữ liệu được thực hiện bằng hệ thống dữ liệu Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Phương pháp V1005V1012

Ngoài quy trình chung VDR1: phương pháp HPLC pha đảo được thực hiện trên cột C18 cầu X Waters (3,5 μm , 4,6 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,8ml/phút. Hai pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril) được sử dụng để thiết lập điều kiện gradien từ 80% A và 20% B (được giữ trong thời gian 0,5 phút) đến 90% B trong thời gian 4,5 phút, 90% B trong thời gian 4 phút và được tái cân bằng với điều kiện ban đầu trong thời gian 3 phút. Thể tích bơm 5 μl được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V1004V1012

Ngoài quy trình chung VDR1: phương pháp HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Kromasil C18 (3,5 μm , 4,6 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,85ml/phút. Ba pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril; pha động C: 0,2% axit formic + 99,8% nước siêu tinh khiết) được sử dụng để chạy điều kiện gradien từ 35% A, 30% B và 35% C (được giữ trong thời gian 1 phút) đến 100% B trong thời gian 3 phút, 100% B trong thời gian 4,5 phút và được tái cân bằng với điều kiện ban đầu trong thời gian 3 phút. Thể tích bơm 5 μl được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy

bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V1010V1012

Ngoài quy trình chung VDR1: phương pháp HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Waters Atlantis C18 (5 μ m, 3,9 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,8ml/phút. Ba pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril; pha động C: 0,2% axit formic + 99,8% nước siêu tinh khiết) được sử dụng để thiết lập điều kiện gradien từ 50% A và 50% C (được giữ trong thời gian 1,5 phút) đến 10% A, 80% B và 10% C trong thời gian 4,5 phút, được giữ trong thời gian 4 phút và được tái cân bằng với điều kiện ban đầu trong thời gian 3 phút. Thể tích bơm 5 μ l được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V2002V2002 + LCpos_court.olg

Ngoài quy trình chung VDR1: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Kromasil C18 (3,5 μ m, 4,6 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,8ml/phút. Ba pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril; pha động C: 0,2% axit formic + 99,8% nước siêu tinh khiết) được sử dụng để thiết lập điều kiện gradien từ 35% A, 30% B và 35% C (được giữ trong thời gian 1 phút) đến 100% B trong thời gian 4 phút, 100% B trong thời gian 4 phút và được tái cân bằng với điều kiện ban đầu trong thời gian 2 phút. Thể tích bơm 10 μ l được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V2003V2002

Ngoài quy trình chung VDR1: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột X-Bridge C18 (3,5 μ m, 4,6 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,8ml/phút. Hai pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril; được sử dụng để thiết lập điều kiện gradien từ 80% A, 20% B (được giữ trong thời gian 0,5 phút) đến 10% A, 90% B trong thời gian 4,5 phút, được giữ ở nhiệt độ 10% A và 90% B trong thời gian 4 phút và được tái cân bằng với điều kiện ban đầu trong thời gian 3 phút. Thể tích bơm 10 μ l được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V2012V2002

Ngoài quy trình chung VDR1: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Waters Atlantis C18 (5 μ m, 3,9 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,8ml/phút. Ba pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril; pha động C: 0,2% axit formic + 99,8% nước siêu tinh khiết) được sử dụng để chạy điều kiện gradien từ 50% A, 0% B và 50% C (được giữ trong thời gian 1,5 phút) đến 10% A, 80% B và 10% trong 3,5 phút, được giữ trong các điều kiện này trong thời gian 4 phút và được tái cân bằng với điều kiện ban đầu trong thời gian 3 phút. Thể tích bơm 10 μ l được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V2015V2007

Ngoài quy trình chung VDR1: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Supelco Ascentis Express C18 (2,7 μ m, 3,0 x 50 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,7ml/phút. Hai pha động (pha động A: 100% 7 mM amoni axetat; pha động B: 100% axetonitril) được sử dụng để chạy điều kiện gradien từ 80% A và 20% B (được giữ trong thời gian 0,5 phút) đến 5% A và 95% B trong 2,5 phút, được giữ trong thời gian 4,5 phút và trở lại điều kiện ban đầu trong thời gian 1,5 phút và được giữ trong thời gian 1 phút. Thể tích bơm 5ml được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,4 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,3 giây.

Phương pháp V3018V3001

Ngoài quy trình chung VDR2: UPLC pha đảo được thực hiện trên cột Waters Acquity BEH (dạng lai etyl siloxan/silic oxit được bắc cầu) C18 (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,343ml/phút. Hai pha động (pha động A: 95% 7 mM amoni axetat / 5% axetonitril; pha động B: 100% axetonitril) được sử dụng để thiết lập điều kiện gradien từ 84,2% A và 15,8% B (được giữ trong 0,49 phút) đến 10,5% A và 89,5% B trong 2,18 phút, được giữ trong 1,94 phút và trở lại điều kiện ban đầu trong 0,73 phút, được giữ trong thời gian 0,73 phút. Thể tích bơm 2 μ l được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,2 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,1 giây.

Phương pháp V3014V3001

Ngoài quy trình chung VDR2: UPLC pha đảo được thực hiện trên cột Waters HSS (High Strength Silica) T3 (1,8 μ m, 2,1 x 100 mm) với tốc độ dòng chảy là 0,35ml/phút. Hai pha động (pha động A: 95% 7 mM amoni axetat / 5% axetonitril; pha động B: 100% axetonitril) được sử dụng để thiết lập điều kiện gradien từ 99% A (được giữ trong thời gian 0,5 phút) đến 15% A và 85% B trong thời gian 4,5 phút, được giữ trong thời gian 2 phút và trở lại điều kiện ban đầu trong thời gian 0,5 phút, được giữ trong thời gian 1,5 phút. Thể tích bơm 2 μ l được sử dụng. Điện áp hình nón là 20V đối với kiểu ion hoá dương và kiểu ion hoá âm. Khối phổ được thu lấy bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong thời gian 0,2 giây bằng cách sử dụng độ trễ giữa các lần quét là 0,1 giây.

Hoạt tính sinh học của hợp chất có công thức (I)

Mô tả thử nghiệm sinh học

Thử nghiệm thông báo để đánh giá hoạt tính của TLR7 (24 giờ)

Khả năng của hợp chất để hoạt hoá TLR7 ở người được đánh giá trong thử nghiệm thông báo tế bào bằng cách sử dụng tế bào HEK293 được biến nạp tạm thời với vectơ biểu hiện TLR7 hoặc TLR8 và cấu trúc thông báo NF κ B-luc. Trong một trường hợp, cấu trúc biểu hiện TLR biểu hiện trình tự kiểu đại tương ứng hoặc trình tự đột biến chứa đột biến khuyết trong đoạn lặp giàu loxin thứ hai (dLR2) của TLR.

Protein TLR đột biến như vậy trước đây đã được chứng minh là dễ bị ảnh hưởng hơn đối với sự hoạt hoá chất chủ vận (US 7,498,409).

Một cách ngắn gọn, tế bào HEK293 được cho phát triển trong môi trường nuôi cấy (DMEM có bổ sung 10% FCS và 2 mM glutamin). Để biến nạp tế bào trong các đĩa 10 cm, các tế bào được tách rời bằng Trypsin-EDTA, được biến nạp bằng hỗn hợp của plasmid CMV-TLR7 hoặc TLR8 (750 ng), plasmid NF κ B-luc (375 ng) và chất thử biến nạp và được ủ lần lượt trong thời gian 24 giờ hoặc 48 giờ ở nhiệt độ 37°C trong khí quyển CO₂ 5% được làm ẩm. Các tế bào được biến nạp sau đó được tách rời bằng Trypsin-EDTA, được rửa trong PBS và được tạo huyền phù lại trong môi trường đến mật độ $1,67 \times 10^5$ tế bào/mL. Ba mươi microlit tế bào sau đó được phân phối vào mỗi lỗ trong các đĩa 384 lỗ, mà 10 μ L hợp chất trong 4% DMSO đã có mặt. Sau khi ủ 6 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, hoạt tính luciferaza được xác định bằng cách bổ sung 15 μ L cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) vào mỗi lỗ và tiến hành đọc kết quả trên bộ chụp ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Đường cong đáp ứng liều lượng được tạo ra từ các phép đo được thực hiện trong bốn bản sao. Các giá trị nồng độ hữu hiệu thấp nhất (lowest effective concentration - LEC), được xác định là nồng độ mà gây ra tác dụng mà ít nhất bằng hai lần độ lệch chuẩn ở trên của thử nghiệm, được xác định đối với mỗi hợp chất. Độ độc của hợp chất được xác định song song bằng cách sử dụng dãy pha loãng tương tự của hợp chất với 30 μ L mỗi lỗ của tế bào được biến nạp bằng một mình cấu trúc CMV-TLR7 ($1,67 \times 10^5$ tế bào/mL), trong đĩa 384 lỗ. Khả năng sống của tế bào được đo sau khi ủ 6 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ bằng cách bổ sung 15 μ L ATP lite (Perkin Elmer) mỗi lỗ và đọc kết quả trên bộ chụp ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Dữ liệu được báo cáo dưới dạng CC50.

Đánh giá sự sản xuất interferon ở PBMC ở người (PBMC-HUH7_{EC50})

Sự hoạt hoá của TLR7 ở người dẫn đến sự sản xuất mạnh mẽ interferon bởi tế bào phân nhánh plasma có mặt trong máu người. Khả năng của hợp chất để kích thích interferon được đánh giá bằng cách theo dõi hoạt tính kháng virus trong hệ sao chép HCV khi ủ với môi trường có điều kiện từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC). Thử nghiệm sao chép HCV dựa trên cấu trúc biểu hiện hai xistron, như được mô tả bởi Lohmann et al. (Science (1999) 285: 110-113; Journal of Virology (2003) 77: 3007-15 3019) với các cải biến được mô tả bởi Krieger

et al. (Journal of Virology (2001) 75: 4614-4624). Thử nghiệm này sử dụng dòng tế bào được biến nạp ổn định Huh-7 luc/neo chứa ARN mã hoá cho cấu trúc biểu hiện hai xistron chứa các vùng NS3-NS5B kiểu đại của HCV typ 1b được dịch mã từ vị trí gắn ribosom bên trong (Internal Ribosome Entry Site - IRES) từ virus viêm não cơ tim (encephalomyocarditis virus - EMCV), đứng trước là gen chỉ thị (Luciferaza đom đóm) và gen đánh dấu chọn lọc (neoR, neomycin phosphotransferaza). Cấu trúc này được chặn bởi 5' và 3' NTR (các vùng không dịch mã) từ HCV typ 1b. Môi trường nuôi cấy liên tục của tế bào sao chép với sự có mặt của G418 (neoR) phụ thuộc vào sự sao chép của ARN HCV. Tế bào sao chép được biến nạp ổn định mà sao chép ARN HCV một cách tự động và đến mức độ cao, mã hoá cho luciferaza không kể những cái khác, được sử dụng để định hình môi trường nuôi cấy tế bào có điều kiện. Tóm lại, PBMC được tạo ra từ lớp phủ màu da bò của ít nhất hai thể cho bằng cách sử dụng quy trình ly tâm Ficoll tiêu chuẩn. PBMC được phân lập được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI có bổ sung 10% huyết thanh AB ở người và 2×10^5 tế bào/lỗ được phân phối vào tám 384 lỗ chứa hợp chất (tổng thể tích 70 μ L). Sau khi ủ qua đêm, 10 μ L dịch nổi bề mặt được chuyển sang tám 384 lỗ chứa $2,2 \times 10^3$ tế bào sao chép/lỗ trong 30 μ L (được cho vào đĩa vào ngày hôm trước). Sau khi ủ 24 giờ, sự sao chép được đo bằng thử nghiệm hoạt tính luciferaza bằng cách sử dụng 40 μ L/lỗ cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) và đo bằng bộ chụp ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Hoạt tính ức chế của mỗi hợp chất trên tế bào Huh7-luc/neo được báo cáo dưới dạng giá trị EC₅₀, được xác định dưới dạng nồng độ hợp chất được áp dụng cho PBMC dẫn đến sự giảm 50% hoạt tính luciferaza mà sự giảm hoạt tính luciferaza này cho thấy mức độ sao chép của ARN sao chép khi chuyển lượng xác định của môi trường nuôi cấy PBMC. Interferon tái tổ hợp α -2a (Roferon-A) được sử dụng làm hợp chất đối chứng tiêu chuẩn. Tất cả các hợp chất thể hiện CC₅₀ >24 μ M trong thử nghiệm HEK 293 TOX được mô tả ở trên.

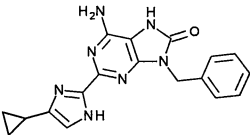
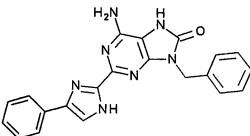
Đánh giá sự sản xuất interferon trong PBMC ở người (PBMC HEK-ISRE-luc LEC)

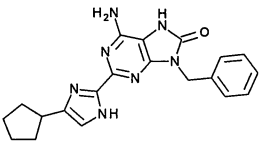
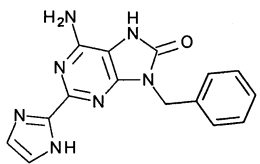
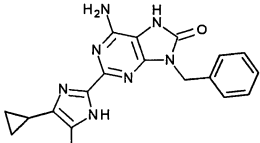
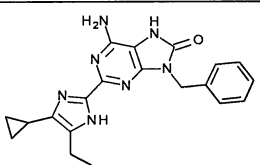
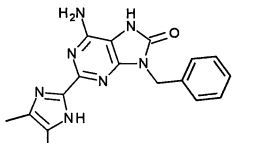
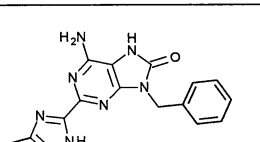
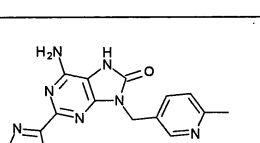
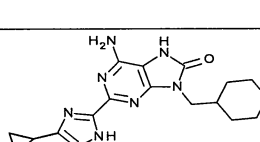
Sự hoạt hoá của TLR7 ở người dẫn đến sự sản xuất mạnh mẽ của interferon bởi tế bào phân nhánh plasma có mặt trong máu người. Khả năng của hợp chất để kích thích interferon được đánh giá bằng cách xác định interferon trong môi trường có điều kiện từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC). Sự

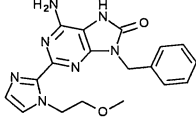
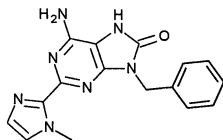
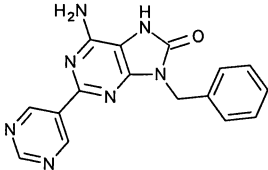
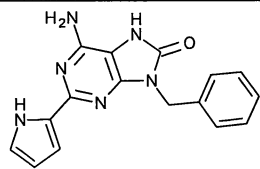
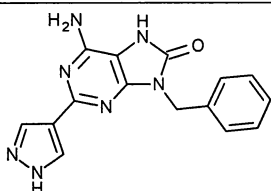
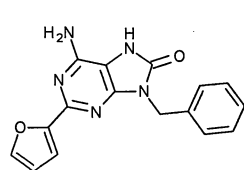
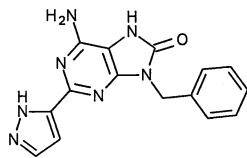
có mặt của interferon trong các mẫu được xác định, bằng cách sử dụng dòng tế bào chỉ thị interferon biểu hiện ổn định cấu trúc chỉ thị của các yếu tố đáp ứng được kích thích bởi interferon (ISRE)-luc. Yếu tố ISRE với trình tự GAAACTGAACT đáp ứng cao với nhân tố phiên mã STAT1-STAT2-IRF9, Tóm lại, PBMC được tạo ra từ lớp phủ màu da bò của ít nhất hai thể cho bằng cách sử dụng quy trình ly tâm Ficoll tiêu chuẩn. PBMC được phân lập được tạo huyền phù lại trong môi trường RPMI có bổ sung 10% huyết thanh AB ở người và 2×10^5 tế bào/lỗ được phân phối vào đĩa 384 lỗ chứa hợp chất (tổng thể tích 70 μL). Sau khi ủ qua đêm PBMC với hợp chất, 10 μL dịch nổi bề mặt được chuyển sang đĩa 384 lỗ chứa 5×10^3 HEK-ISRE-luc tế bào/lỗ trong 30 μL (được cho vào đĩa vào ngày hôm trước). Sau khi ủ 24 giờ, sự hoạt hoá của yếu tố ISRE được đo bằng thử nghiệm hoạt tính luciferaza bằng cách sử dụng 40 μL /lỗ cơ chất Steady Lite Plus (Perkin Elmer) và đo bằng bộ chụp ảnh vi đĩa ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Hoạt tính kích thích của mỗi hợp chất trên tế bào HEK-ISRE-luc được báo cáo dưới dạng LEC. LEC lần lượt cho thấy mức độ hoạt hoá ISRE đối với việc chuyển lượng xác định của môi trường nuôi cấy PBMC. Interferon tái tổ hợp alfa-2a (Roferon-A) được sử dụng làm hợp chất đối chứng tiêu chuẩn.

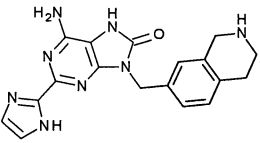
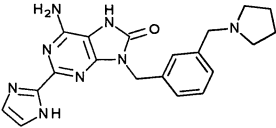
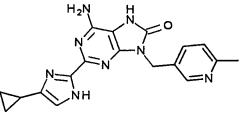
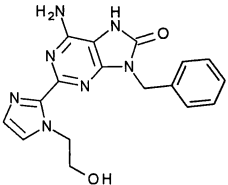
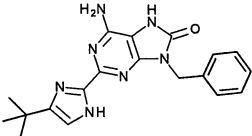
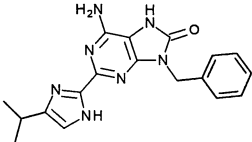
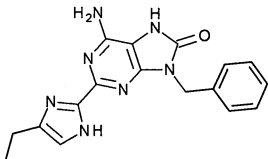
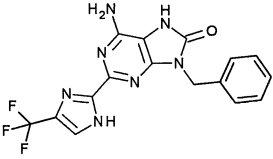
Giá trị LEC đối với hợp chất trong bảng 2 trên HEK293 TLR8-NF κ B-luc và HEK293 NF κ B-luc mà lớn hơn nồng độ được thử nghiệm cao nhất ($> 10 \mu\text{M}$ đối với hợp chất 6 và $> 25 \mu\text{M}$ đối với tất cả các hợp chất khác).

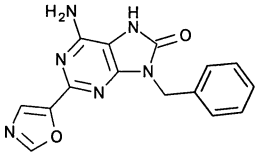
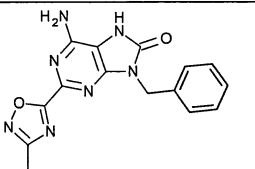
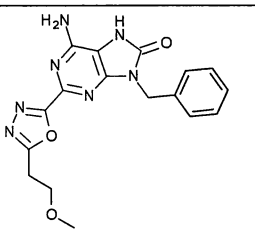
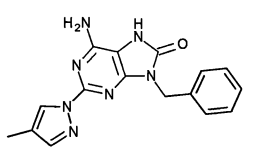
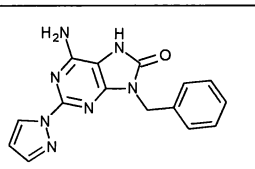
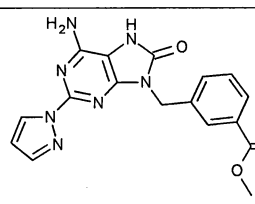
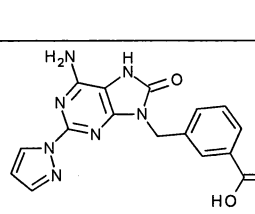
Bảng 2. Hoạt tính sinh học của hợp chất có công thức (I)

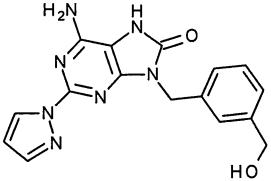
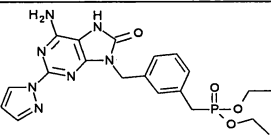
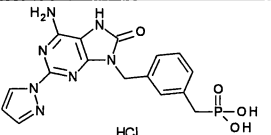
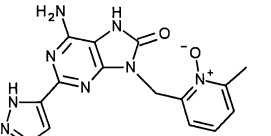
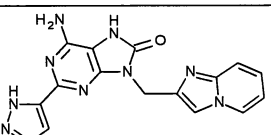
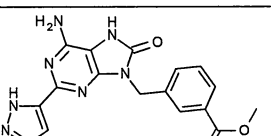
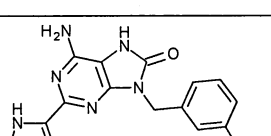
#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μM)	TLR7- d1RR2_LEC 24 giờ (μM)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μM)	TLR7- d1RR2_ LEC 48 giờ (μM)	PBMC- HUH7_ EC50 (μM)	PBMC HEK-ISRE- luc (LEC; μM)
1			0,33	8,25	0,18	0,081	0,064
2		4,72	1,2			0,531	

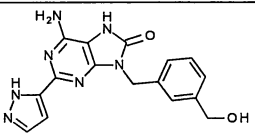
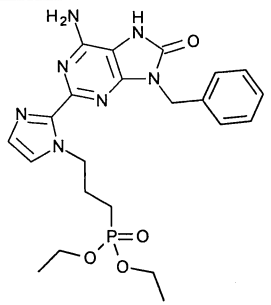
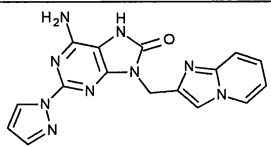
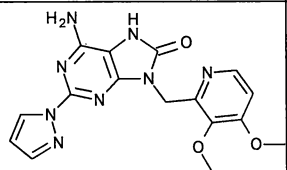
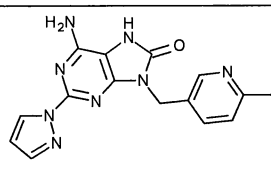
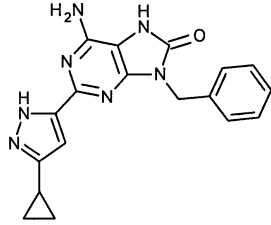
#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
3		>24,59	7,67			13,97	
4			0,077	1,23	0,04	0,16	0,12
5			2,2	21,47	1,13	0,2	0,13
6			0,66	6,32	0,34	0,053	0,04
7				>25	1,46	0,64	0,88
8				5,91	0,17	0,17	0,25
9				0,88	0,07	0,05	0,03
10			18,93	>25	10,13	0,73	0,44

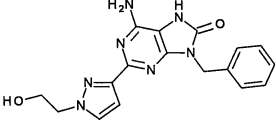
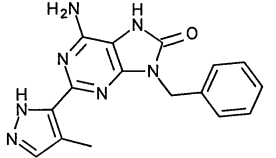
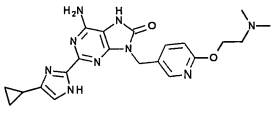
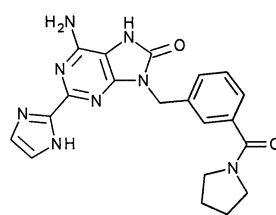
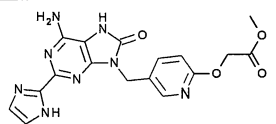
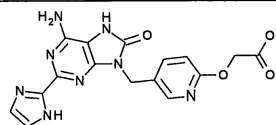
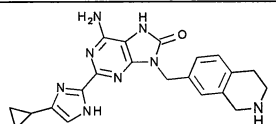
#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2- LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7- EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
11				5,36	0,19	0,33	0,32
12				8,08	0,3	0,59	0,34
15		>24,59	10,57	>25	9,75	16,94	
18		>24,59	3,23	20,31	3,81	2,58	
19		>24,59	13,31	>25	16,6	12,36	
20			0,5	6,34	0,5	0,68	
23				0,23	0,007	0,13	0,12

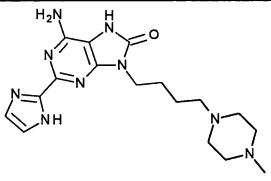
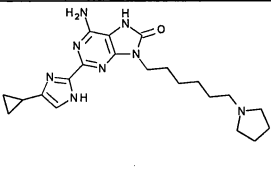
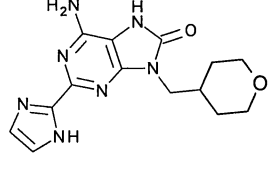
#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
24				1,81	0,11	0,046	0,03
25				2,46	0,39	0,006	0,007
26				2,42	0,21	0,005	0,006
27				6,03	0,63	0,8	0,43
28				>25	8,77	>23,81	>23,81
29					1,58	1,66	0,82
30				12,71	0,14	0,17	0,12
31				23,23	0,51	1,3	2,2

#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
32				6,5	0,97	1,51	0,97
33				21,66	0,98	0,81	0,52
34				>25	1,21	0,69	0,49
35				0,36	0,033	0,17	0,10
36				0,22	0,017	0,047	0,033
37				0,05			0,01
38				0,38			>25

#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
39				0,05			0,01
40				0,03			0,01
41				0,03			0,40
42				1,73			0,45
43				0,50			0,15
44				0,10			0,04
45				0,58			1,37

#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
46				0,21			0,03
47				14,12			1,64
48				0,01			0,01
49				0,31			0,06
50				0,03			0,01
51				0,16			0,17

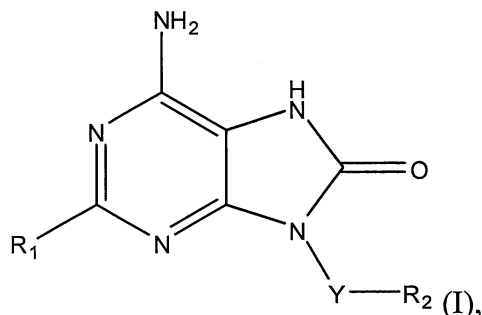
#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
52				4,42	0,41		0,42
53				3,17	0,36	0,76	
54				16,1	5,65	0,05	0,07
55				4,11	0,06	1,27	1,16
57				0,44	0,06	1,21	1,38
58				0,99	0,06	2,75	2,69
60				>25	1,25	0,034	0,019

#	CẤU TRÚC	TLR7- wt_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_LEC 24 giờ (μ M)	TLR7- wt_LEC 48 giờ (μ M)	TLR7- dIRR2_ LEC 48 giờ (μ M)	PBMC- HUH7_ EC50 (μ M)	PBMC HEK-ISRE- <i>luc</i> (LEC; μ M)
61				>25	9,73	1,34	0,95
62				21,2	>25	0,70	0,72
63				>25	2,58	6,72	4,39

Tất cả các hợp chất được thử nghiệm trong các thử nghiệm thông báo để đánh giá hoạt tính của TLR8 và LEC được thể hiện > 17 μ M.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I)



hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình được dựng của chúng, trong đó Y là (C₁₋₄) alkylen,

R₁ được chọn từ nhóm bao gồm imidazolyl, pyrimidyl, pyrrolyl, pyrazolyl, furyl, oxazolyl, oxadiazolyl, isoxazolyl, pyrazinyl và thiazolyl, trong đó R₁ tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₄ alkoxy, triflometyl, C₃₋₆ xycloalkyl, phenyl, halogen, hydroxyl-C₁₋₄ alkyl, C₁₋₄-alkoxy-C₁₋₄-alkyl- và C₁₋₄alkyl-dietoxyphosphoryl;

R₂ được chọn từ nhóm bao gồm phenyl, naphtyl, antraxenyl và phenantrenyl, trong đó R₂ tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydroxyl, C₁₋₆ alkyl, C₁₋₄ alkoxy, triflometyl, CO₂R₃, halogen, hydroxyl-C₁₋₄ alkyl-, NR₆R₇, C(O)R₆, C(O)NR₆R₇, C₁₋₄ alkyl-dietoxyphosphoryl hoặc axit C₁₋₄ alkyl-phosphonic;

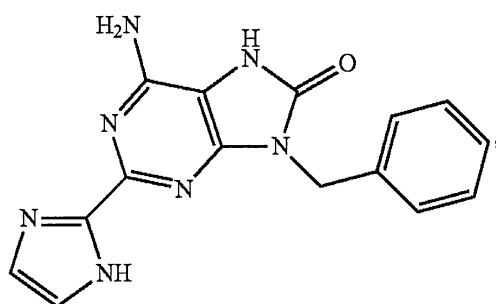
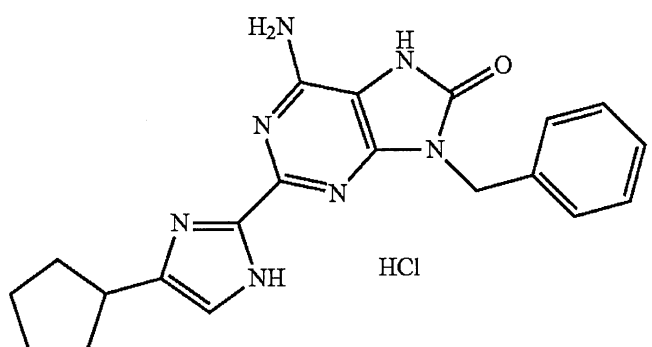
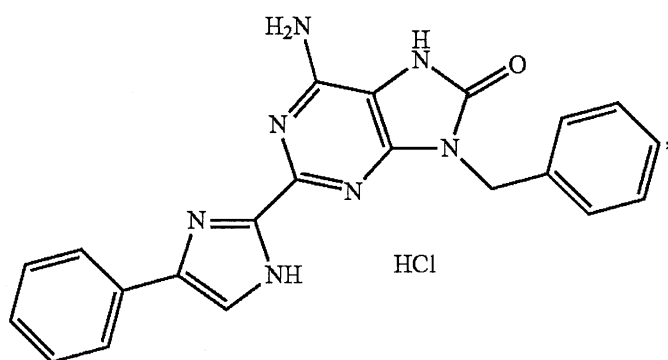
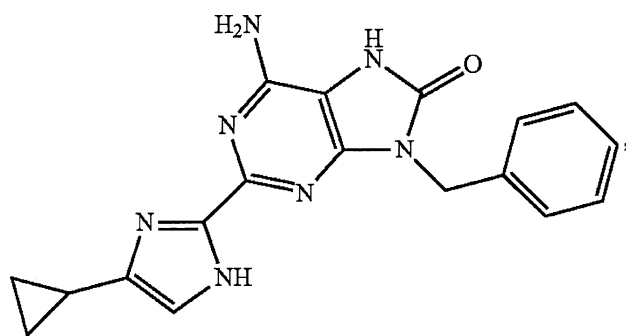
R₃ được chọn từ H và C₁₋₆ alkyl;

mỗi R₆ và R₇ độc lập được chọn từ H, C₁₋₆ alkyl hoặc C₁₋₄ alkoxy.

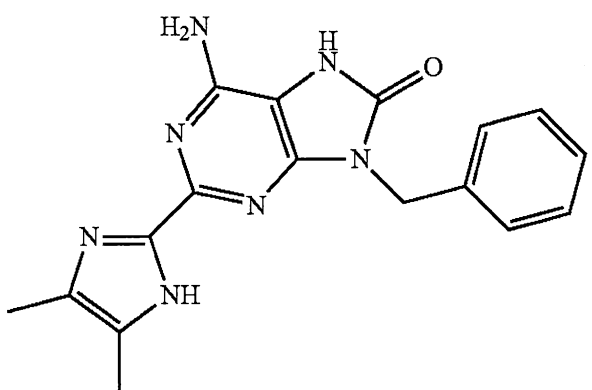
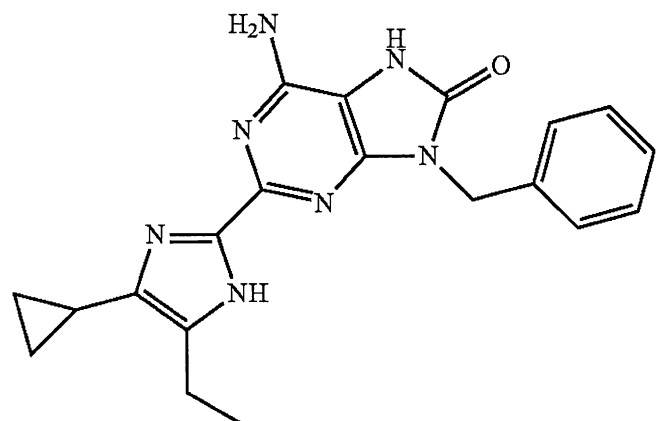
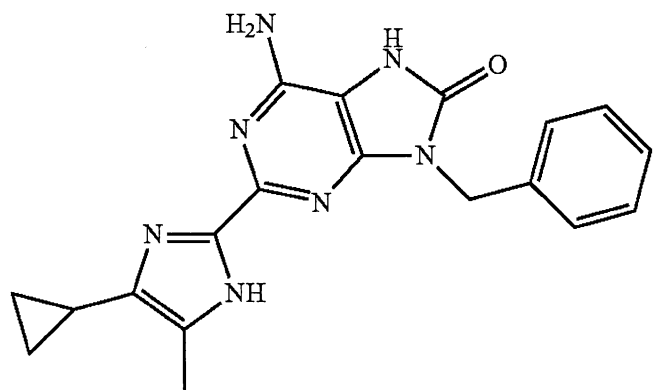
2. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình được dựng của chúng theo điểm 1, cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang được dựng.

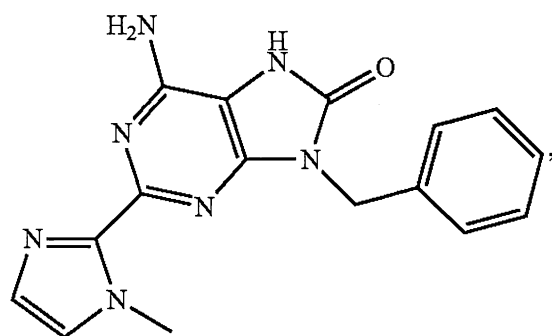
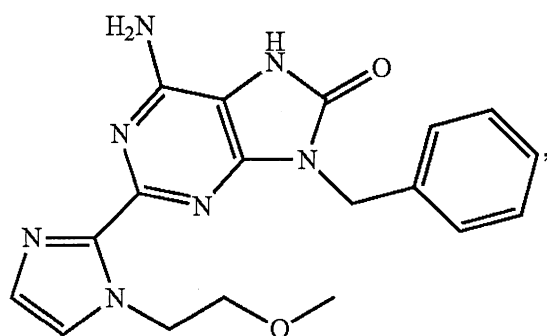
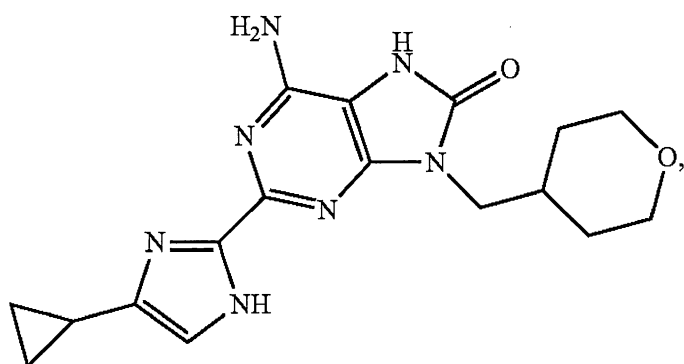
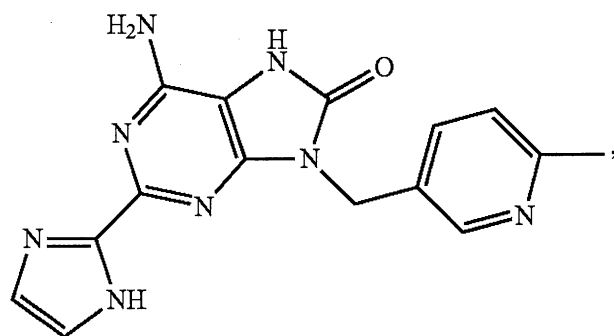
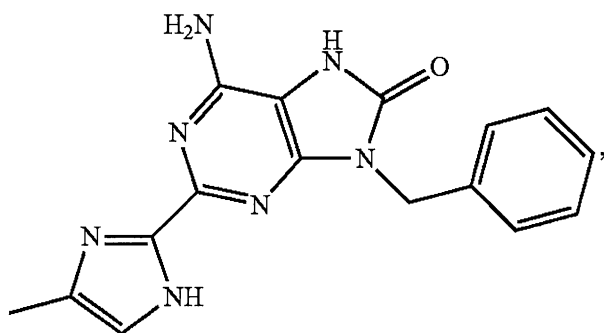
3. Hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

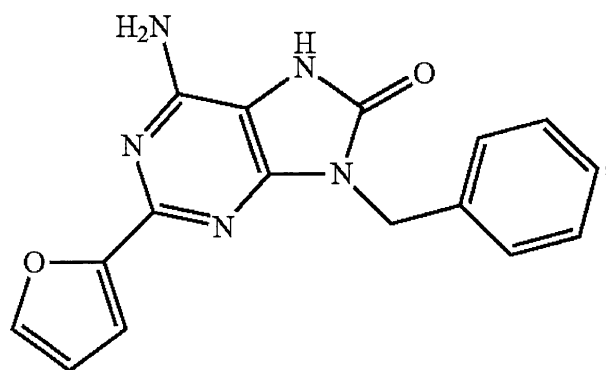
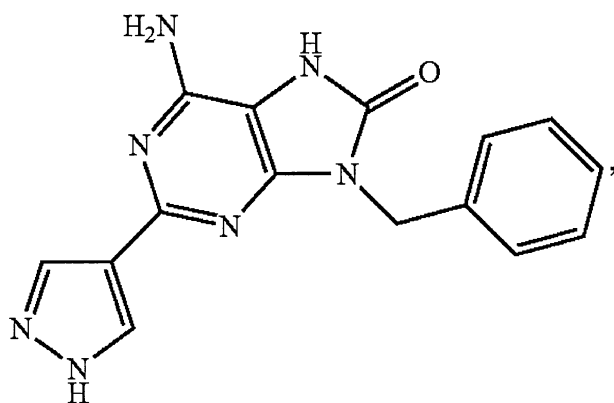
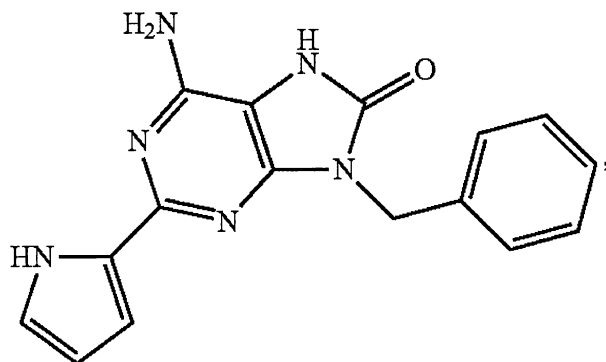
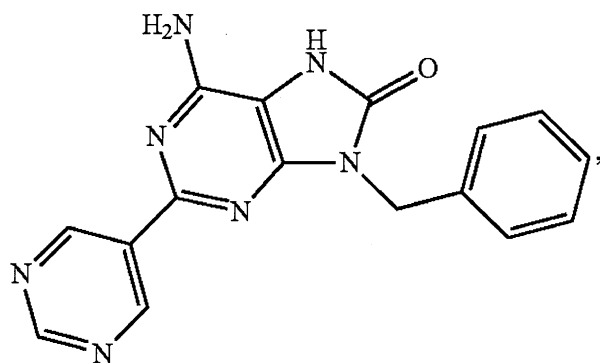
19635



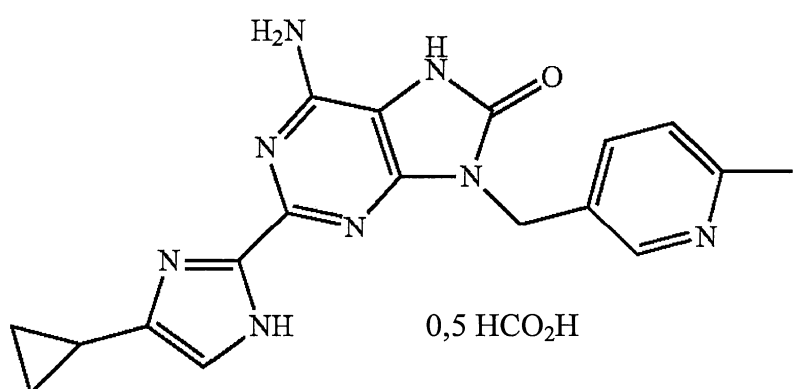
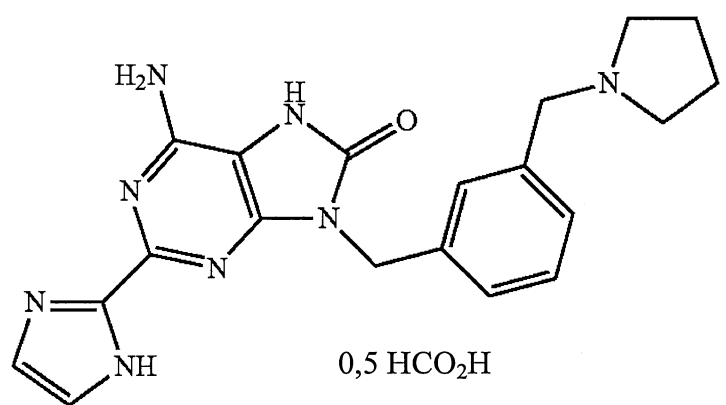
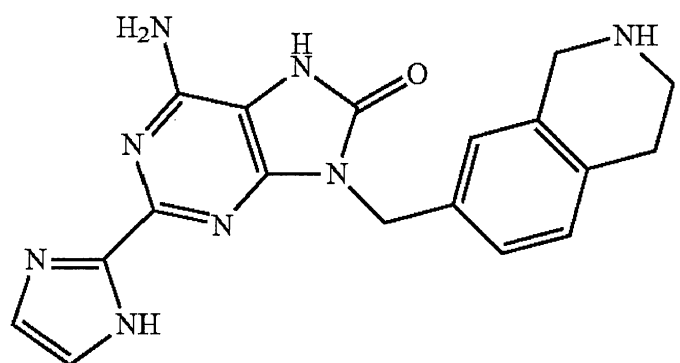
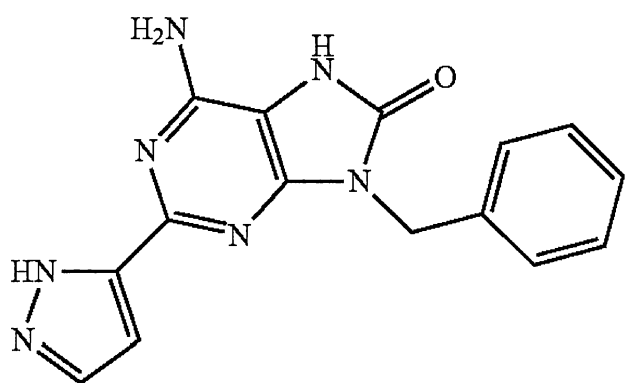
19635

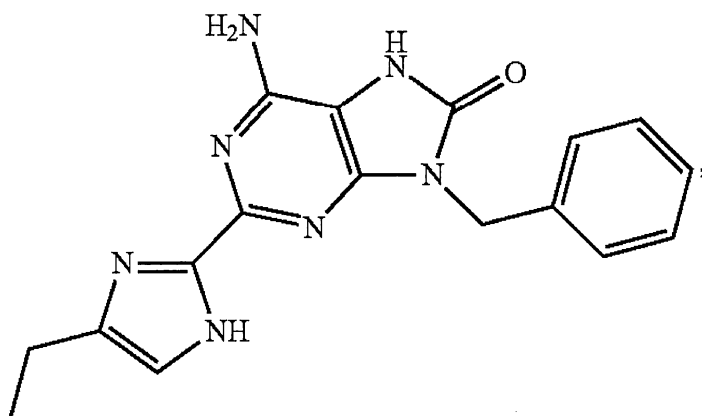
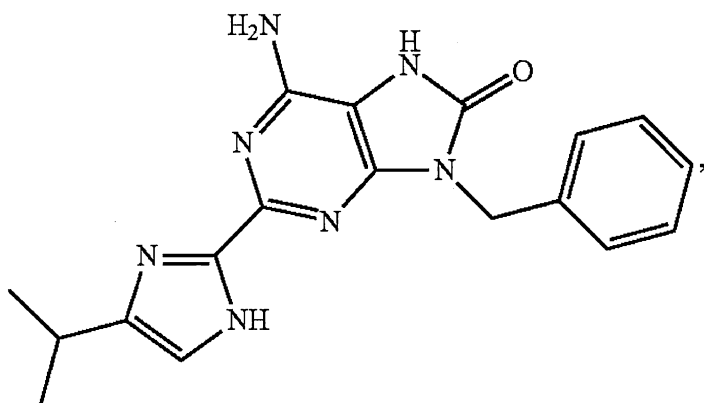
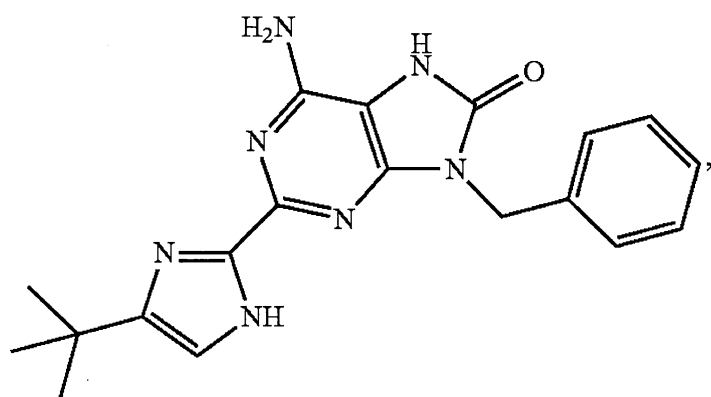
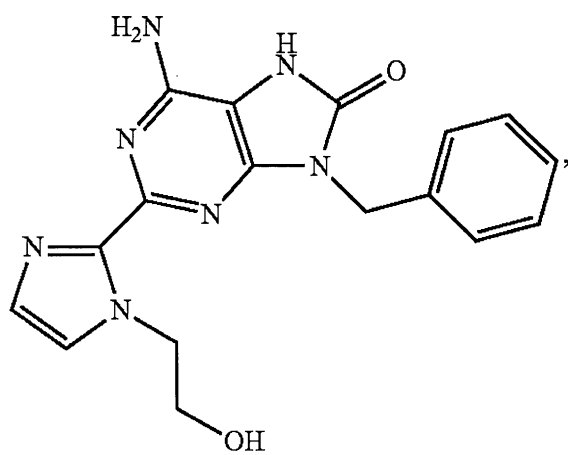


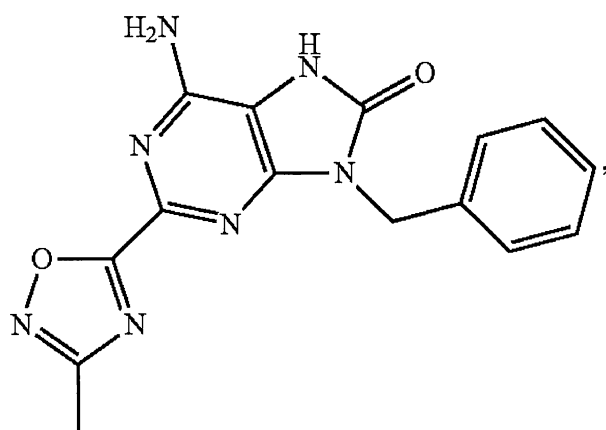
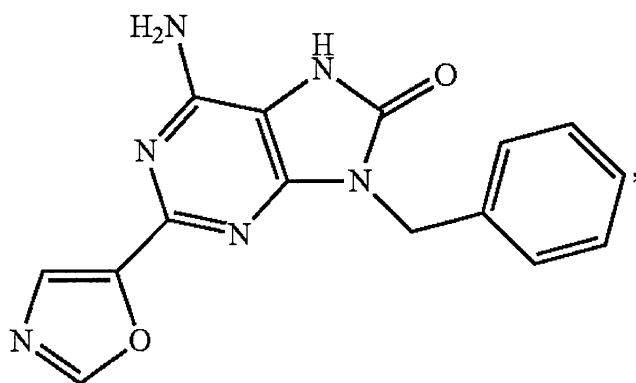
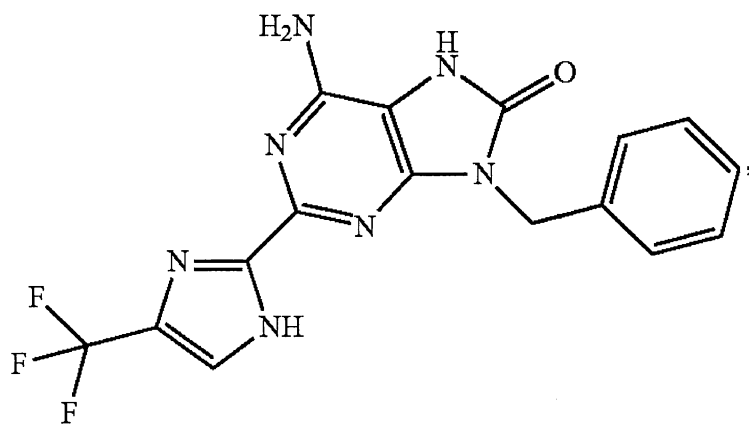


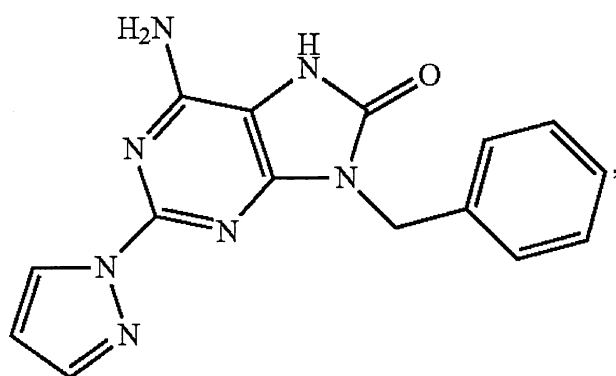
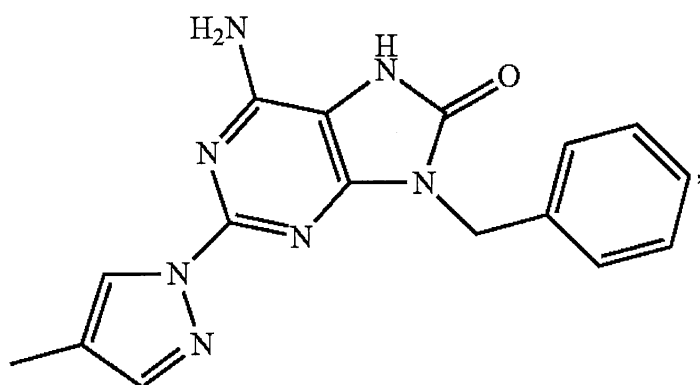
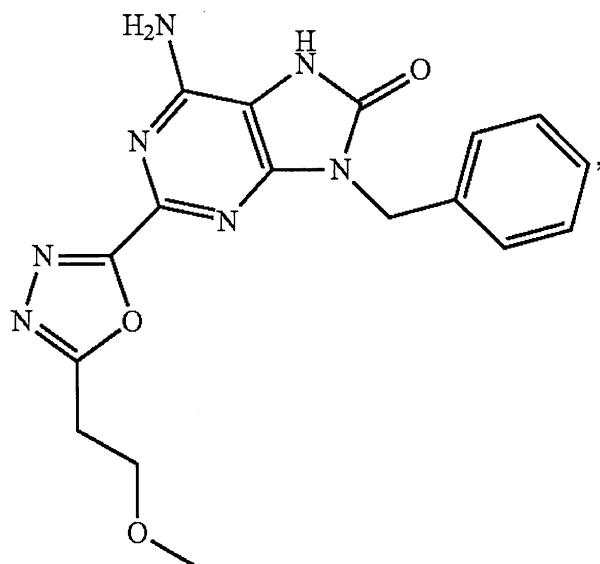


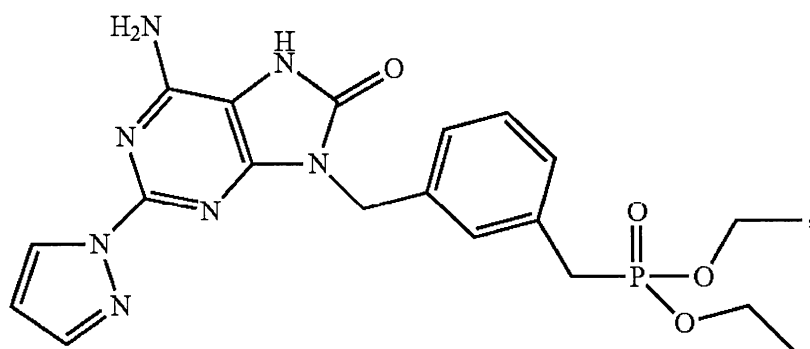
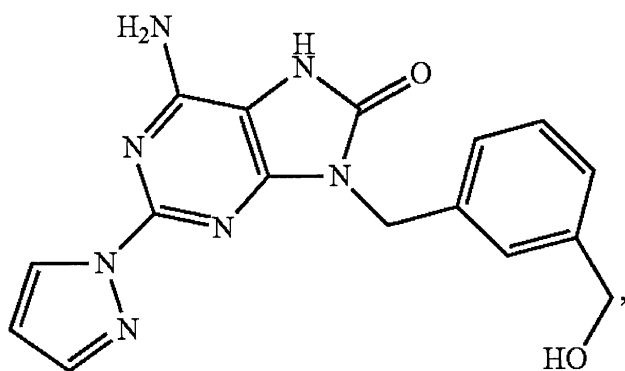
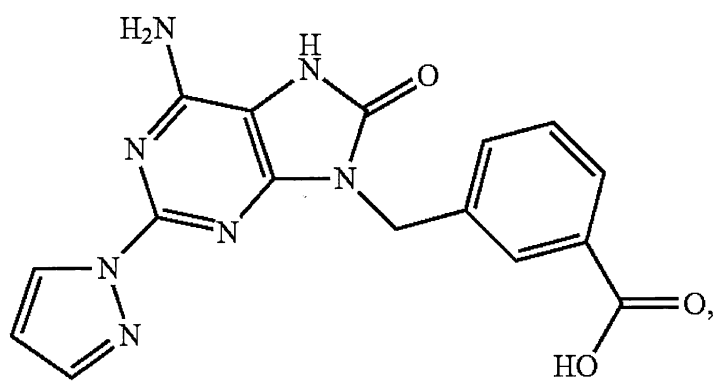
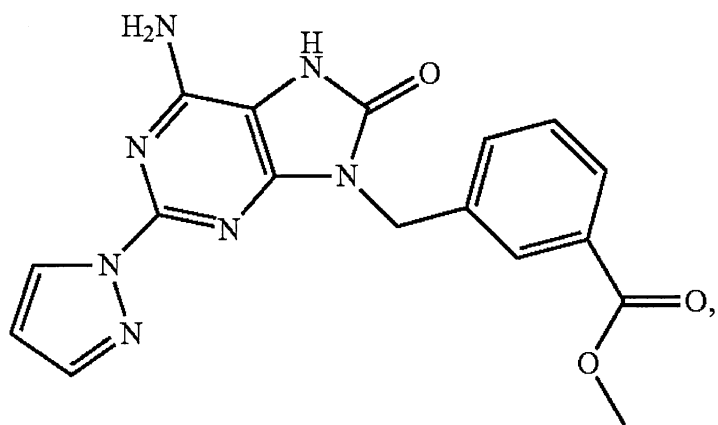
19635

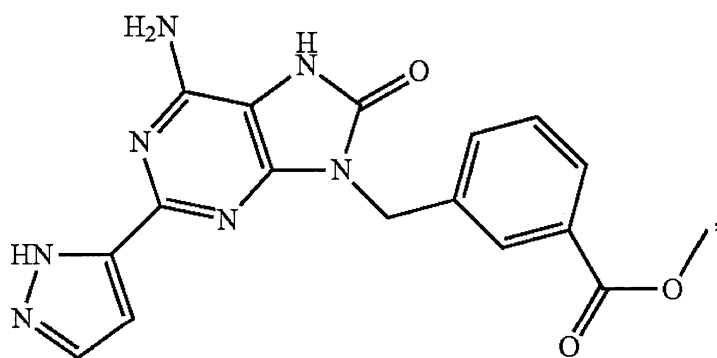
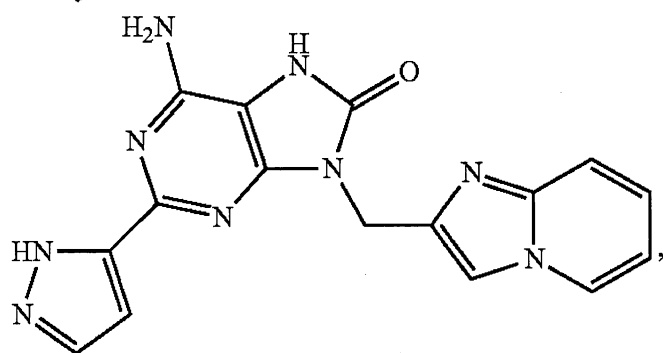
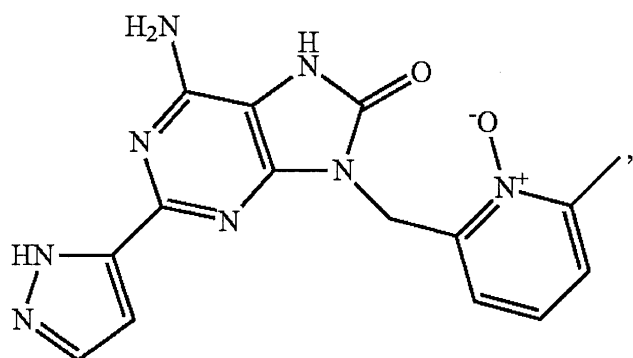
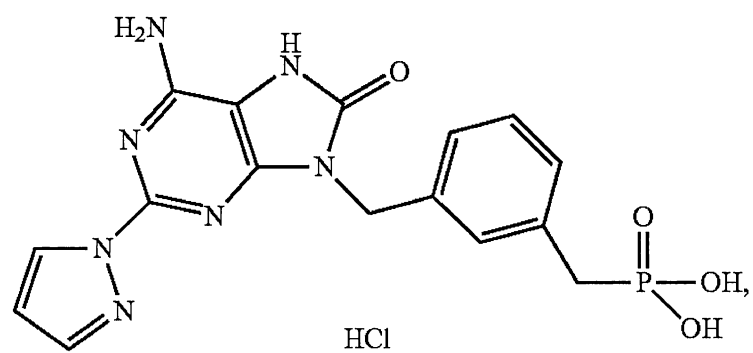


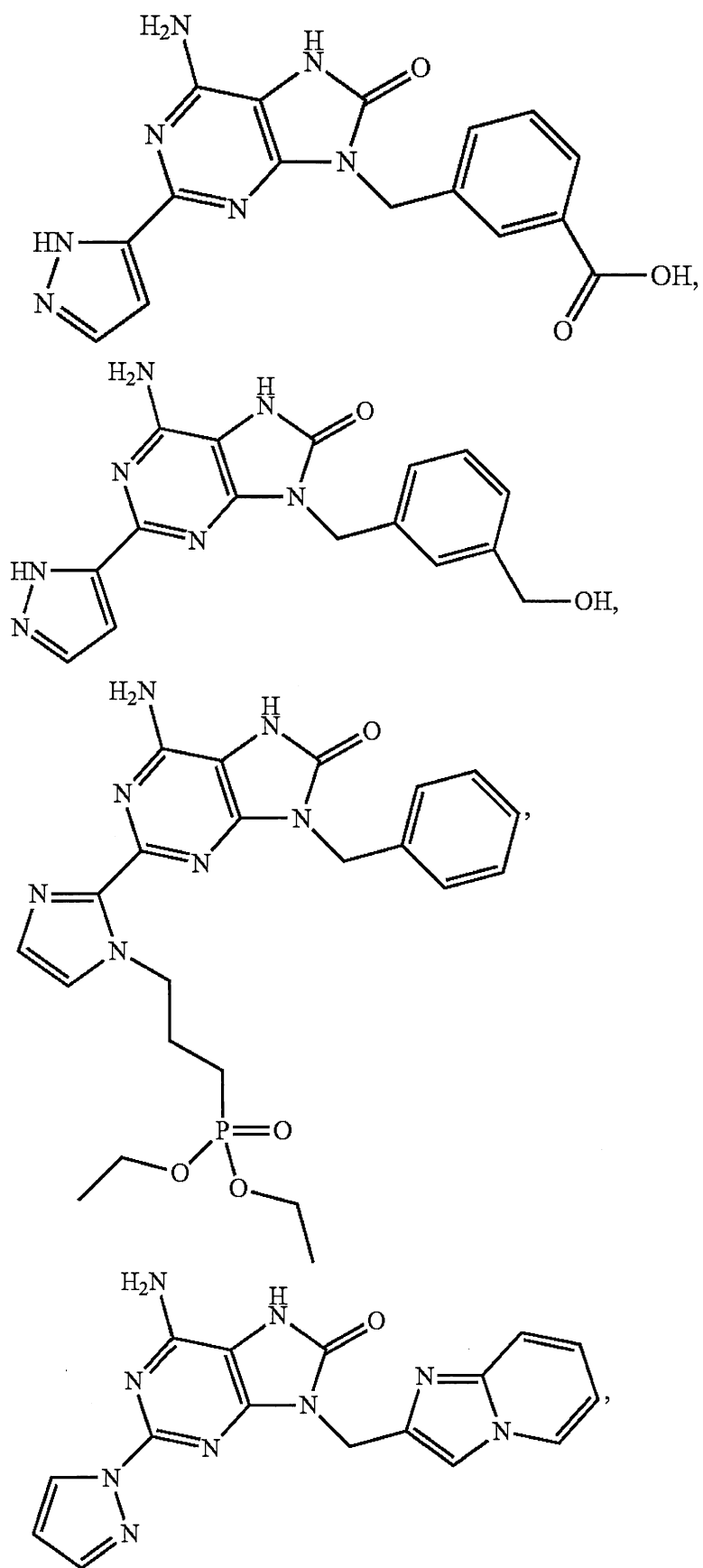


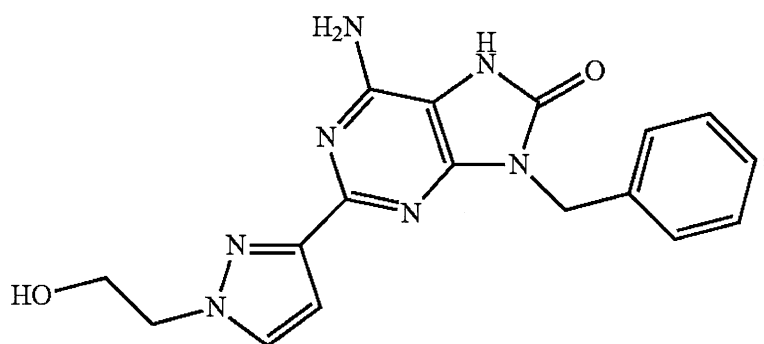
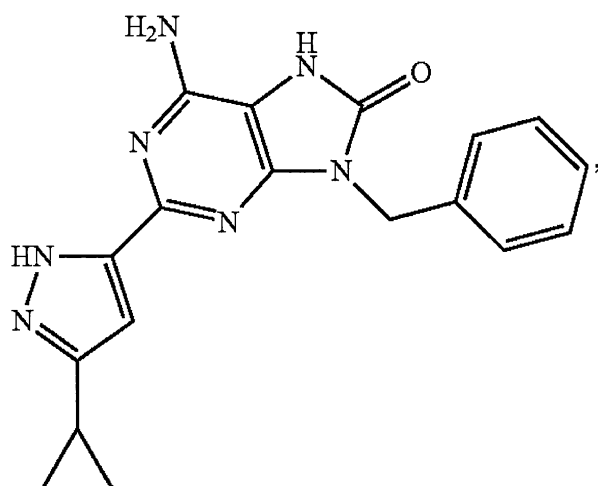
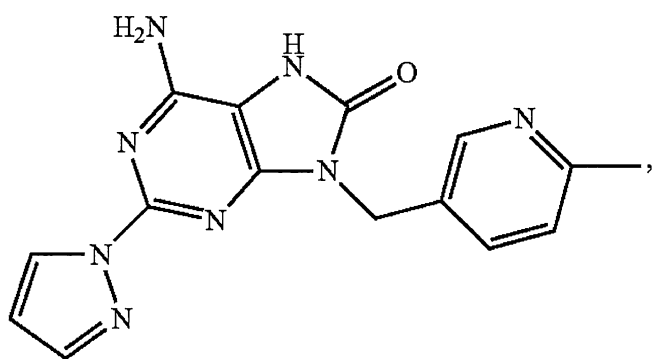
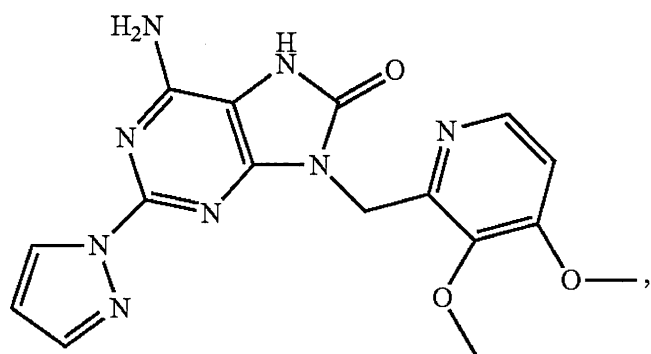


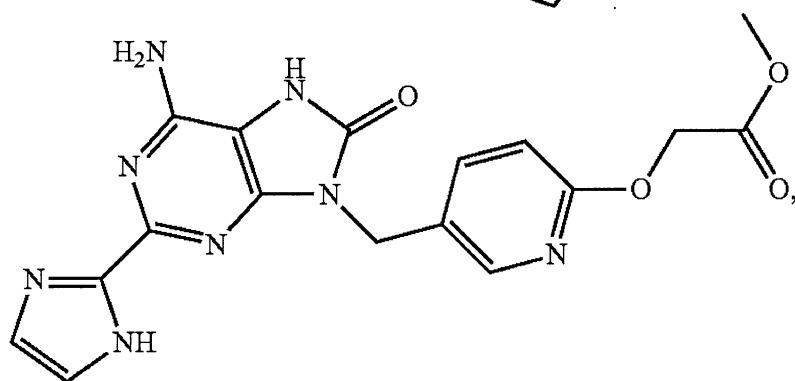
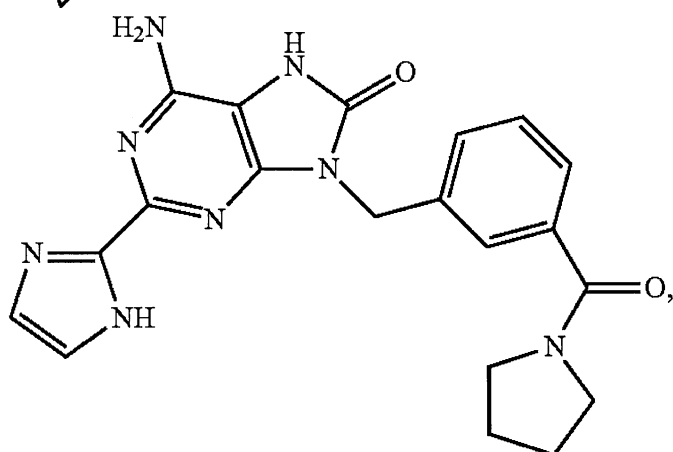
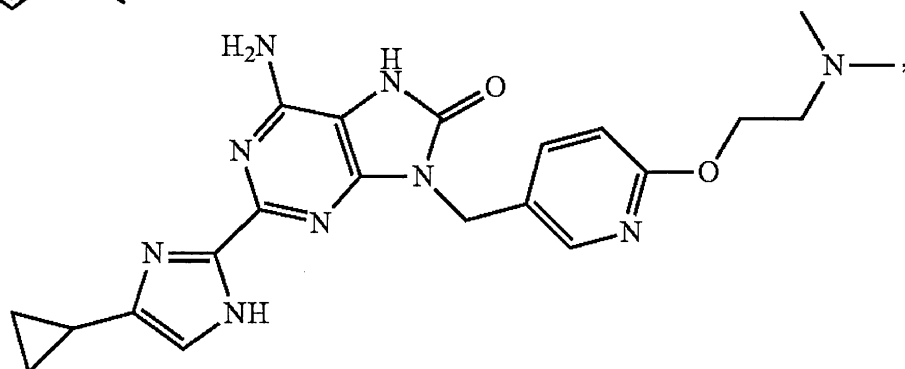
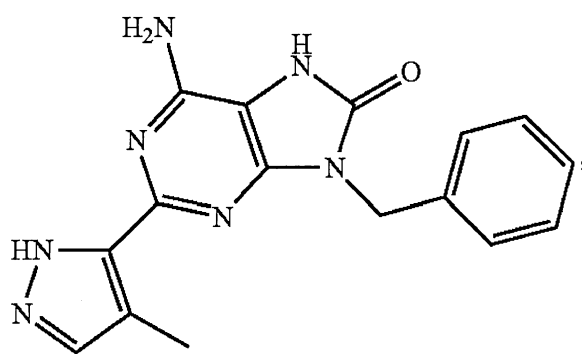


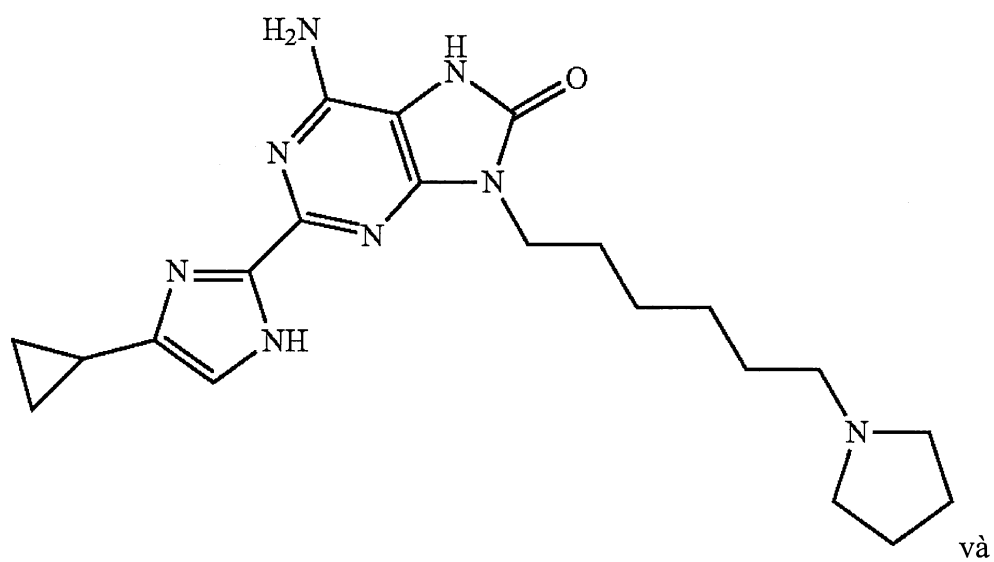
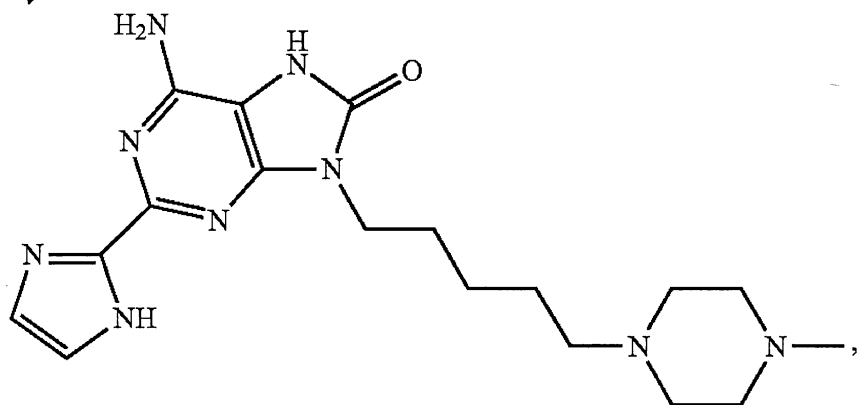
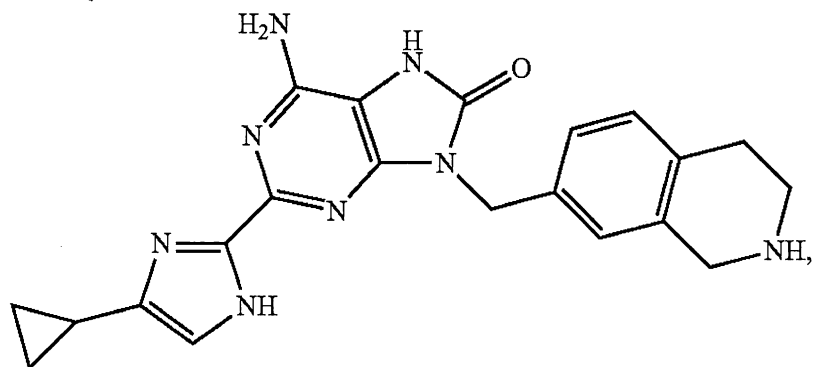
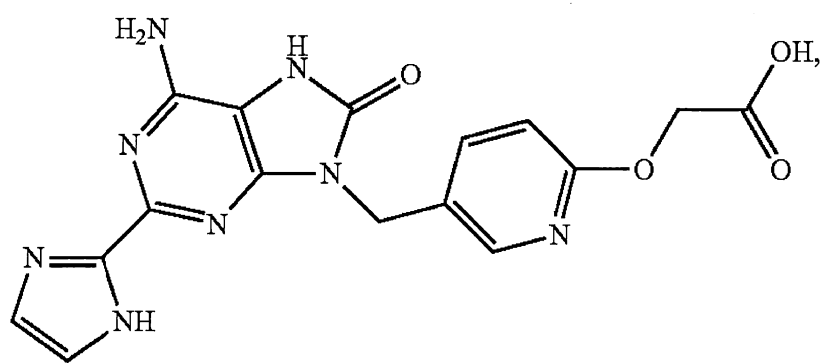


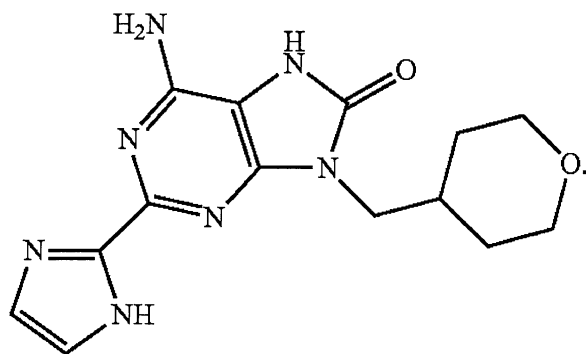












4. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối, solvat hoặc chất đa hình dược dụng của chúng theo điểm 3, cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.