



(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)



1-0025121

(51)⁷ A61K 31/381; A61P 31/14; A61K
31/513; A61K 31/4184; A61K 31/4196

(13) B

(21) 1-2018-02076

(22) 14/09/2012

(62) 1-2014-01180

(86) PCT/US2012/055621 14/09/2012

(87) WO2013/040492 21/03/2013

(30) 61/535,885 16/09/2011 US; 61/561,753 18/11/2011 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 27/10/2014 319A

(73) Gilead Pharmasset LLC (US)

c/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404, United States of America

(72) RAY, Adrian S. (US); WATKINS, William J. (GB); LINK, John O. (US);
OLDACH, David W. (US); DELANEY, IV, William E. (US).

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

(54) VIÊN NÉN CHỨA TỔ HỢP CÁC PHÂN TỬ TRỊ LIỆU ĐIỀU TRỊ BỆNH NHIỄM
VIRUT VIÊM GAN C (HCV)

(57) Sáng chế đề cập đến viên nén chứa tổ hợp các phân tử trị liệu hữu dụng để điều trị
bệnh nhiễm virus viêm gan C.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến viên nén chứa tổ hợp các phân tử trị liệu hữu dụng để điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm gan là bệnh xuất hiện trên toàn thế giới. Bệnh viêm gan thường có bản chất virus, mặc dù nếu được coi là trạng thái viêm gan mạn tính thì còn có các nguyên nhân không lây nhiễm đã biết khác. Bệnh viêm gan do virus là dạng phổ biến nhất của bệnh viêm gan cho đến nay. Trung tâm kiểm soát bệnh Hoa Kỳ (U.S. Centers for Disease Control) ước tính rằng ít nhất 1,8% dân số Hoa Kỳ có bằng chứng huyết thanh học về tình trạng nhiễm virus viêm gan C (HCV) trong phần lớn các trường hợp có liên quan đến tình trạng nhiễm virus dạng hoạt động mạn tính. HCV là virus chứa ARN sợi dương thuộc họ Flaviviridae và có mối quan hệ mật thiết nhất với pestivirus mà bao gồm virus gây bệnh tả ở lợn và virus gây bệnh tiêu chảy ở bò.

Hệ gen HCV là ARN sợi đơn, chiều dương có khoảng 9600 cặp bazơ mã hoá cho polyprotein có 3009-3030 axit amin, mà được phân cắt đồng thời và sau quá trình dịch mã bằng proteinaza tế bào và hai proteinaza virus thành protein virus trưởng thành (lõi, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Protein cấu trúc, E1 và E2, được cho là gắn vào vỏ lipid của virus và tạo thành dị dime ổn định. Protein lõi cấu trúc được cho là tương tác với hệ gen ARN của virus để tạo thành nucleocapsit. Các protein không cấu trúc, được gọi là NS2 đến NS5, bao gồm các protein có chức năng enzym tham gia vào quá trình sao chép virus và xử lý protein bao gồm polymeaza, proteaza và helicaza. HCV sao chép thông qua quá trình sản xuất khuôn ARN sợi âm bổ sung.

HCV là virus đa dạng về mặt di truyền. Có thể nhận diện được nhiều virus biến thể trong một người bệnh bị nhiễm đơn lẻ, do đó còn gọi là ‘quần thể virus’ hoặc “chủng virus biến đổi”. Trong quần thể người trên thế giới, HCV cũng đa dạng về mặt di truyền, với ít nhất 6 ‘kiểu gen’ chính đã được nhận diện (kiểu gen 1-6) và một số kiểu phụ (tức là, kiểu gen HCV 1a và 1b). Kiểu gen HCV được xác định bằng phân

tích phát sinh loài từ dữ liệu hệ gen, và được chẩn đoán (ở người bệnh nhất định) bằng thử nghiệm chẩn đoán dựa trên trình tự ARN của HCV.

Con đường nhiễm HCV chính là thông qua sự tiếp xúc máu. Mức độ nghiêm trọng của tình trạng nhiễm HCV với tính chất là một vấn đề về sức khỏe được minh họa bởi tỷ lệ hiện hành trong các nhóm có nguy cơ cao. Ví dụ, trong một số cuộc khảo sát, 60% đến 90% số người mắc bệnh máu khó đông và hơn 80% số người lạm dụng thuốc dùng qua đường tĩnh mạch ở các nước phương Tây có tình trạng nhiễm HCV mạn tính. Đối với những người lạm dụng thuốc dùng qua đường tĩnh mạch, tỷ lệ hiện hành thay đổi trong khoảng từ khoảng 28% đến 80% tùy thuộc vào quần thể được nghiên cứu. Tỷ lệ các trường hợp nhiễm HCV mới có liên quan đến việc truyền máu hoặc sản phẩm máu đã giảm đáng kể nhờ các tiến bộ trong ngành dược và việc sử dụng rộng rãi các thử nghiệm phát hiện ARN và huyết thanh nhạy được sử dụng để sàng lọc người cho máu, tuy nhiên, vẫn còn một số lượng lớn những người cao tuổi bị nhiễm mạn tính.

Một phương pháp hiện có để điều trị tình trạng nhiễm HCV là interferon- α được PEG hoá (PEG-IFN α 1a hoặc PEG-IFN α 1b), mà theo hướng dẫn điều trị hiện nay, được dùng hằng tuần bằng cách tiêm dưới da trong thời gian từ 24 đến 48 tuần, tùy thuộc vào kiểu gen virus HCV cần điều trị. Mặc dù hơn 50% số bệnh nhân bị nhiễm kiểu gen HCV 1 có thể được mong đợi là sẽ ức chế virus-huyết HCV khi kết thúc 48 tuần điều trị, nhưng tỷ lệ đáng kể trong số các bệnh nhân này sẽ bị tái phát nhiễm virus. Do đó, đáp ứng virus kéo dài (SVR: Sustained Virologic Response, được định nghĩa là trạng thái âm tính với ARN của HCV 24 tuần sau khi ngừng điều trị, và được coi là tương đương với 'việc chữa khỏi') chỉ đạt được ở 30-40% số trường hợp nhiễm kiểu gen HCV 1 được điều trị bằng PEG-IFN đơn lẻ. Ngoài ra, việc điều trị bằng PEG-IFN + RBV cũng không được dung nạp tốt, với đặc tính tác dụng bất lợi bao gồm các triệu chứng giống cảm cúm, giảm lượng tiểu cầu, thiếu máu, và các tác dụng phụ tâm thần nghiêm trọng. Mặc dù việc điều trị theo tiêu chuẩn chăm sóc hiện nay là gần tối ưu, nhưng nhiều bệnh nhân đã bị loại trừ ngay từ khi bắt đầu điều trị do mắc các bệnh đi kèm phổ biến trong quần thể nhiễm HCV, bao gồm rối loạn tâm thần, bệnh gan tiến triển và chứng lạm dụng thuốc.

Ribavirin là thuốc kháng virus tương tự nucleosit. Ribavirin thường được dùng qua đường miệng (bằng miệng) hai lần một ngày. Cơ chế chính xác của ribavirin là

chưa biết. Tuy nhiên, ribavirin được tin rằng khi đi vào tế bào, nó được phosphoryl hoá; sau đó đóng vai trò làm chất ức chế inosin 5'-monophosphat dehydrogenaza (IMPDH). Chất ức chế IMPDH như ribavirin làm giảm sự tổng hợp nội bào và dự trữ guanin, là “khối xây dựng” nucleotit cần cho việc sản xuất ADN và ARN, do đó ức chế sự sao chép virus. Chất ức chế IMPDH cũng cản trở việc sản sinh các tế bào tăng sinh nhanh và các tế bào có tốc độ tuần hoàn protein cao. Việc điều trị bằng liệu pháp ribavirin đơn lẻ ít có tác dụng đối với lượng ARN của HCV, nhưng có liên quan đến sự sụt giảm alanin transferaza (ALT) trong huyết thanh. Hiện tượng này gợi ý rằng ribavirin có thể không có tác dụng làm chất kháng virus, mà đúng hơn là có tác dụng làm chất điều biến chức năng của hệ miễn dịch. Ribavirin chỉ được phê chuẩn để sử dụng cho bệnh nhiễm HCV kết hợp với IFN.

Việc điều trị bằng cách kết hợp PEG-IFN với ribavirin cải thiện tỷ lệ SVR so với tỷ lệ SVR quan sát được đối với PEG-IFN đơn lẻ, chủ yếu là do sự giảm tần suất tái phát nhiễm virus khi ngừng trị liệu. Tỷ lệ SVR thử nghiệm lâm sàng cao đối với các bệnh nhân bị nhiễm kiểu gen HCV 1 được điều trị bằng PEG-IFN/ribavirin nằm trong khoảng từ 40 đến 55%. Hiện tại, liệu pháp PEG-IFN/ribavirin được xem là phương pháp điều trị ‘tiêu chuẩn chăm sóc’ đối với bệnh nhiễm HCV mạn tính. Tuy nhiên, tiêu chuẩn chăm sóc này được mong đợi là sẽ thay đổi nhanh chóng trong tương lai gần với việc phê chuẩn các chất kháng virus tác động trực tiếp mà ban đầu sẽ được sử dụng kết hợp với PEG-IFN/ribavirin.

Đáng tiếc là, các kiểu gen khác nhau của HCV đáp ứng khác nhau với liệu pháp PEG-IFN/ribavirin; ví dụ, kiểu gen HCV 1 có tính kháng liệu pháp cao hơn so với kiểu 2 và kiểu 3. Ngoài ra, nhiều phương pháp điều trị HCV hiện nay gây ra các tác dụng phụ không mong muốn. Do vậy, hiện nay có nhu cầu về các liệu pháp kháng virus mới. Cụ thể là, có nhu cầu về các liệu pháp kháng virus mới mà gây ra ít tác dụng phụ không mong muốn hơn, có hiệu quả hơn trong việc chống lại nhiều kiểu gen HCV, hoặc có lịch trình dùng liều ít phức tạp hơn, tức là cần dùng thuốc ít lần hơn trong ngày.

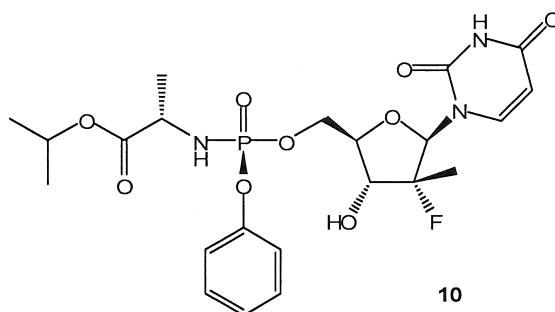
Tài liệu Lawitz E.J., et al., Journal of Hepatology, 2012, vol. 57, pp24-31 báo cáo rằng hợp chất GS-5885 (tương đương với hợp chất 6 nêu trong bản mô tả này, là chất ức chế HCV NS5A polymeraza) có hoạt tính kháng virus ở các bệnh nhân bị nhiễm kiểu gen HCV 1a và 2b.

Tài liệu Lam A.M., et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2010, Vol.54, pp3187-3196 báo cáo rằng hợp chất PSI-7851 (trùng khớp với hợp chất 10 nêu trong bản mô tả này, là chất ức chế nucleosit của HCV NS5B polymeraza) là chất ức chế mọi kiểu gen đối với sự sao chép HCV.

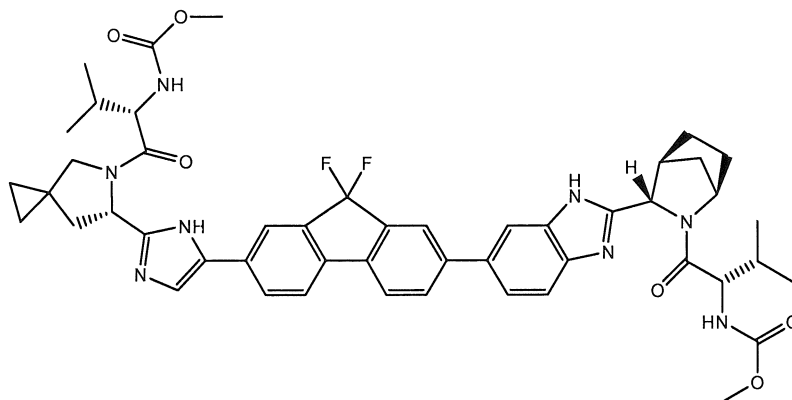
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm hữu dụng để điều trị các bệnh nhiễm virus (ví dụ, bệnh nhiễm virus viêm gan C (HCV)). Một số chế phẩm theo sáng chế gây ra ít tác dụng phụ không mong muốn hơn, có hiệu quả hơn trong việc chống lại nhiều kiểu gen HCV, làm giảm khả năng hồi ứng của virus do chọn lọc tính kháng và có lịch trình dùng liều ít phức tạp hơn và ngắn hơn so với các liệu pháp sẵn có hiện nay.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa: 1) hợp chất 10:



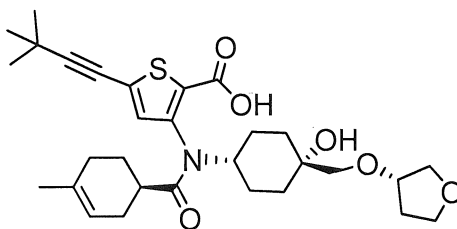
hoặc muối dược dụng của chúng, và 2) hợp chất 6:



6

hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn chứa hợp chất 5:



5

hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo các phương án khác, chế phẩm nêu trên còn chứa một hoặc nhiều chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Chế phẩm nêu trên có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị để dùng một lần một ngày, và/hoặc được bào chế để dùng qua đường miệng, tùy ý ở dạng viên nén.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm nêu trên để sử dụng trong điều trị y tế.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm nêu trên để sử dụng trong điều trị dự phòng hoặc trị liệu bệnh nhiễm HCV. Theo một phương án, chế phẩm này không được sử dụng cùng với interferon. Theo phương án khác, chế phẩm này được sử dụng cùng với ribavirin.

Chế phẩm theo sáng chế có thể tạo ra "tính hiệp đồng" và "tác dụng hiệp đồng", tức là, tác dụng đạt được khi các thành phần hoạt tính (bao gồm hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp) được sử dụng cùng nhau là lớn hơn tổng các tác dụng thu được từ việc sử dụng các hợp chất một cách riêng rẽ.

Chế phẩm theo sáng chế có ích vì chúng mang lại tác dụng điều trị đối với nhiều kiểu gen HCV và vì chúng gây ra ít tác dụng phụ hơn hoặc tác dụng phụ ít nghiêm trọng hơn so với các liệu pháp điều trị HCV hiện có (ví dụ, các phương pháp điều trị mà bao gồm việc sử dụng interferon). Ngoài ra, một số chế phẩm kết hợp chứa các hợp chất (ví dụ, các hợp chất 10 và 6, và các hợp chất 10, 5 và 6) có thể tạo ra đáp ứng virus kéo dài (SVR) cao hơn đáng kể so với đáp ứng đạt được bằng các liệu pháp hiện có (ví dụ, các liệu pháp điều trị HCV). Ví dụ, một số chế phẩm kết hợp chứa các hợp chất có thể tạo ra SVR bằng ít nhất khoảng 70% hoặc ít nhất khoảng 80%.

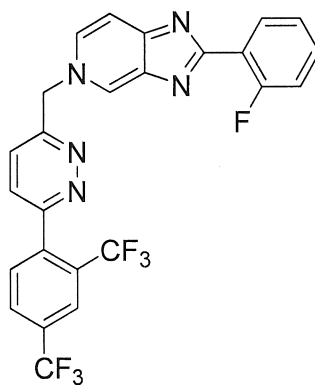
Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ và cụm từ như được sử dụng trong bản mô tả này sau đây được dự định là có các nghĩa như sau. Khi một thuật ngữ hoặc cụm từ cụ thể không được định nghĩa một cách cụ thể, thì điều này không tương quan với sự không xác định hay không rõ ràng, mà các thuật ngữ trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa nguyên gốc của chúng. Khi tên thương mại được sử dụng trong bản mô tả này, thì tên thương mại này được dự định là bao gồm một cách độc lập sản phẩm mang tên thương mại này và (các) thành phần có được tính của sản phẩm mang tên thương mại này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “các hợp chất kết hợp” dùng để chỉ hợp chất 10 và hợp chất 6, và, nếu có mặt hoặc được sử dụng, hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16.

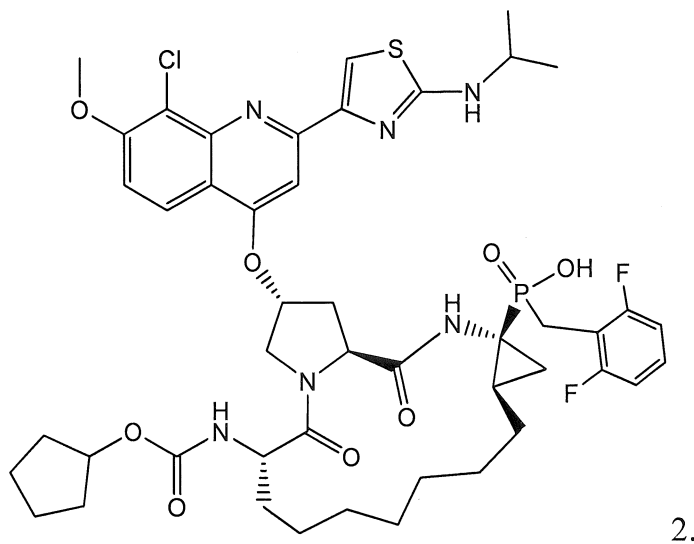
Trong bản mô tả này, hợp chất 1 là:



1.

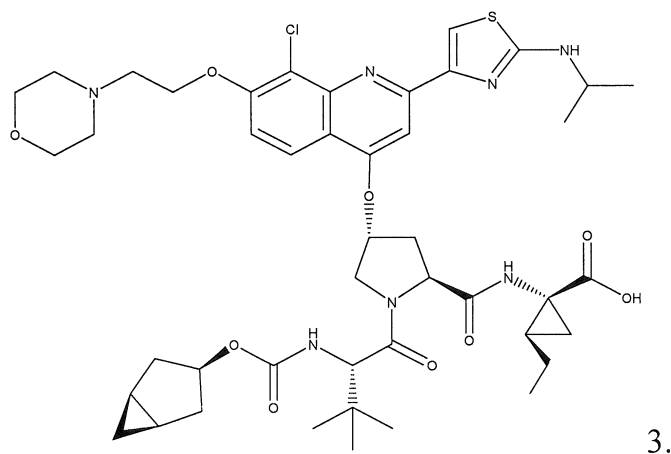
Hợp chất 1 có thể còn được gọi là 5-((6-(2,4-bis(trifluoromethyl)phenyl)pyridazin-3-yl)methyl)-2-(2-fluorophenyl)-5H-imidazo[4,5-c]pyridin hoặc 5H-imidazo[4,5-c]pyridin, 5-[[6-[2,4-bis(trifluoromethyl)phenyl]pyridazin-3-yl)methyl]-2-(2-fluorophenyl).

Trong bản mô tả này, hợp chất 2 là:

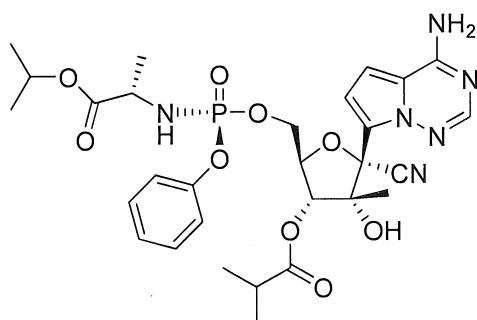


Hợp chất 2 có thể còn được gọi là axit (2*R*,6*S*,13*aR*,14*aS*,16*aS*)-2-(8-clo-2-(2-(isopropylamino)thiazol-4-yl)-7-metoxiquinolin-4-yloxy)-6-(xyclopentyloxycacbonylamino)-5,16-dioxooctadecahydroxycyclopropa[*e*]pyrolo[1,2-*a*][1,4]diazaxycyclopentadexin-14a-yl(2,6-diflobenzyl)phosphinic.

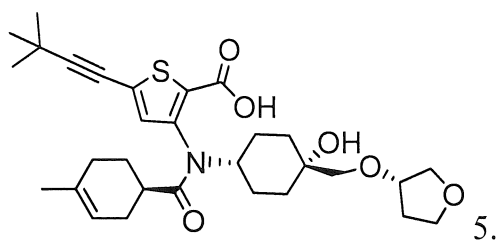
Trong bản mô tả này, hợp chất 3 là:



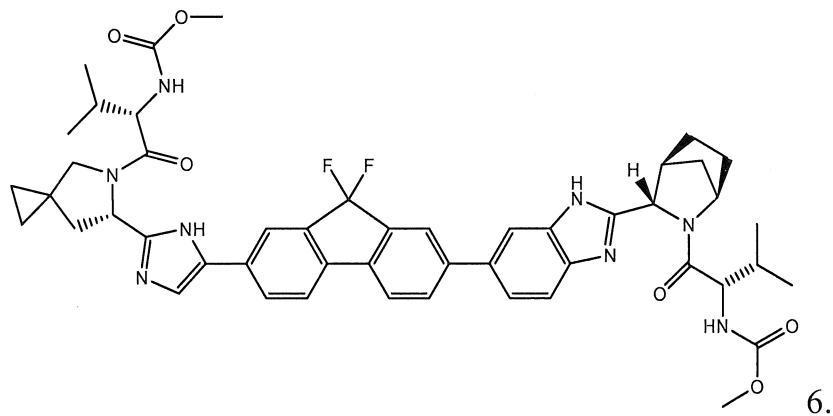
Trong bản mô tả này, hợp chất 4 là:



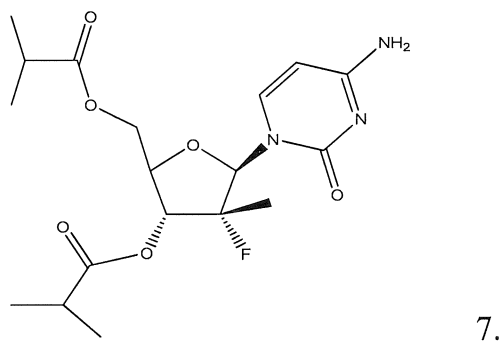
Trong bản mô tả này, hợp chất 5 là:



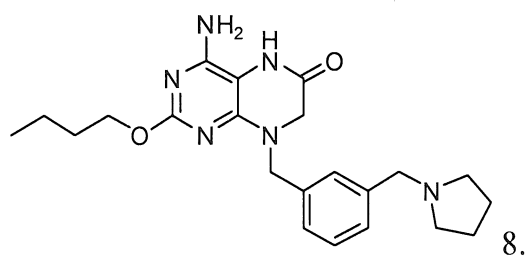
Trong bản mô tả này, hợp chất 6 là:



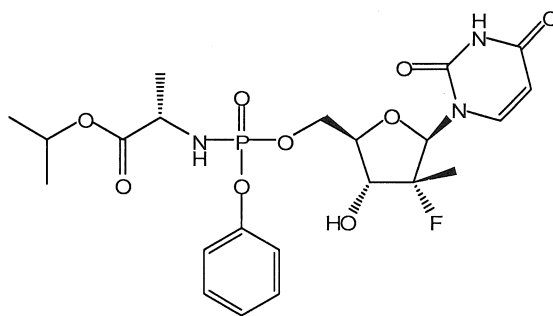
Trong bản mô tả này, hợp chất 7 là:



Trong bản mô tả này, hợp chất 8 là:



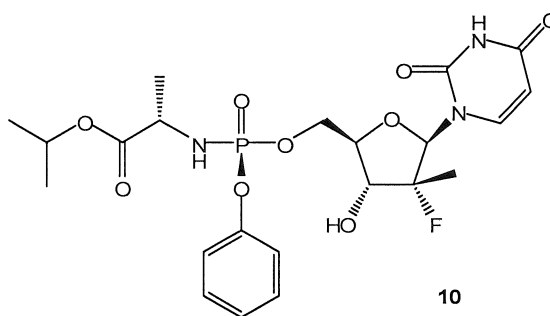
Trong bản mô tả này, hợp chất 9 (chất đồng phân không đối quang tại P) là:



9.

Đối với hợp chất 9, tham khảo US 7,964,580 và US 2010/0298257 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 9 này.

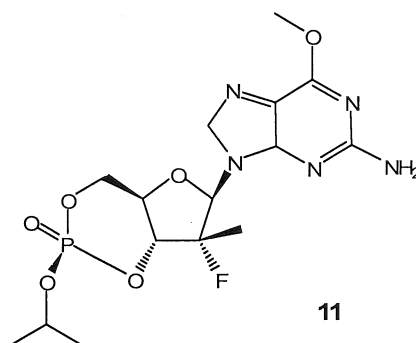
Trong bản mô tả này, hợp chất 10 (chất đồng phân S của hợp chất 9) là:



10

Đối với hợp chất 10, tham khảo US 7,964,580 và US 2010/0298257 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 10 này.

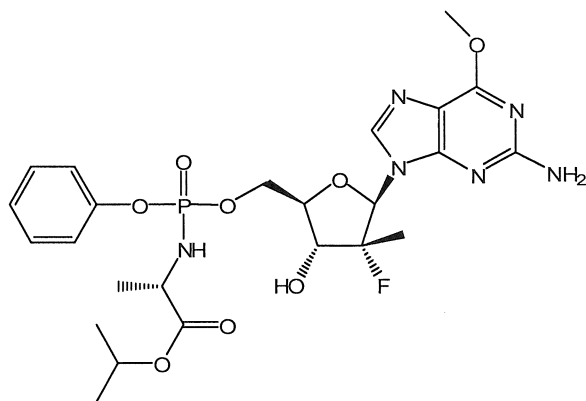
Trong bản mô tả này, hợp chất 11 là:



11

Đối với hợp chất 11, tham khảo US 2010/0081628 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 11 này.

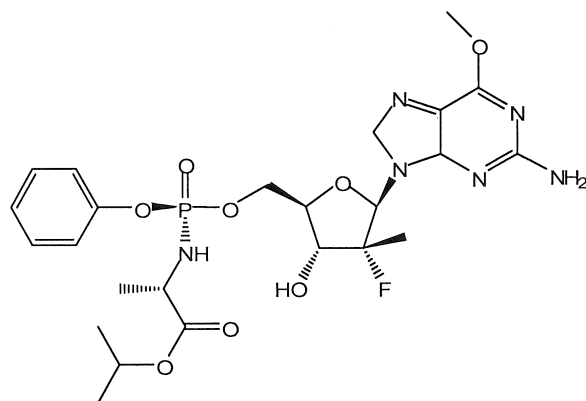
Trong bản mô tả này, hợp chất 12 (chất đồng phân không đối quang tại P) là:



12.

Đối với hợp chất 12, tham khảo US 20110015146 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 12 này.

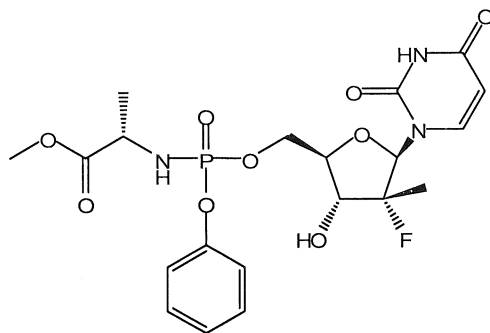
Trong bản mô tả này, hợp chất 13 (chất đồng phân không đối quang S của hợp chất 12 tại P) là:



13.

Đối với hợp chất 13, tham khảo US 20110015146 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 13 này.

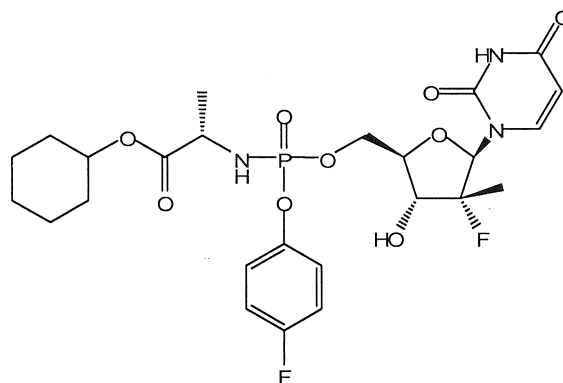
Trong bản mô tả này, hợp chất 14 là:



14.

Đối với hợp chất 14, tham khảo US 7,964,580 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 14 này.

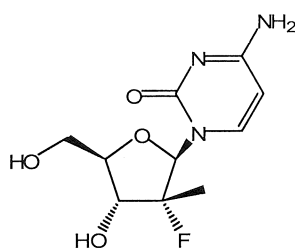
Trong bản mô tả này, hợp chất 15 là:



15.

Đối với hợp chất 15, tham khảo US 7,964,580 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 15 này.

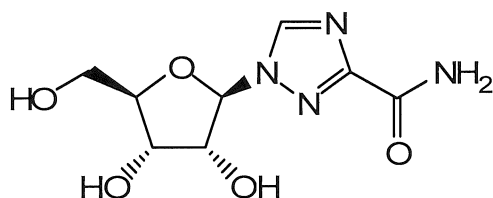
Trong bản mô tả này, hợp chất 16 là:



16.

Đối với hợp chất 16, tham khảo US 7,429,572 về việc sản xuất và tinh chế hợp chất 16 này.

Đối với ribavirin, tham khảo EP 0 093 401 B1 về quy trình sản xuất cũng như danh pháp liên quan đến ribavirin. Trong bản mô tả này, ribavirin dùng để chỉ hợp chất có công thức sau đây:



Ribavirin.

Ribavirin còn được gọi là 1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamit, 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxyamid; 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamit; COPEGUS (Roche); DRG-0028; HSDB 6513; ICN 1229; MegaRibavirin (ví dụ, trong chế phẩm chứa 100 mg ribavirin/mL); NSC 163039; RAVANEX (BioPartners); REBETOL (Schering-Plough; Aesca; Bayer Schering Pharma; Essex; Pfizer; Trading Pharma; Zuellig Pharma); Ribamit; RIBAMIDIL (Biopharma, Russia); RIBASPHERE (Three Rivers Pharmaceuticals); Ribavarin; Ribavirina; Tribavirin;

VILONA (Valeant Pharmaceuticals; ICN Pharmaceuticals); VIRAMID (ICN Pharmaceuticals; Alfa Wassermann); VIRAZOLE (Valeant Pharmaceuticals); và VIRIZADOLE (Uci-farma, Sao Bernardo do Campo, Sao Paulo, Brazil). Ngoài ra, trong bản mô tả này, ribavirin bao gồm các chất tương tự của ribavirin, bao gồm taribavirin (VIRAMIDINE, ICN 3142).

Thuật ngữ “interferon” bao gồm 1) interferon, ví dụ, rIFN-alpha 2b được PEG hoá (PEG-Intron, Merck & Co., Inc.), rIFN-alpha 2a được PEG hoá (PEGASYS, Hoffmann-La Roche Inc.), rIFN-alpha 2b (INTRON® A, Merck & Co., Inc.), rIFN-alpha 2a (Roferon®-A, Hoffmann-La Roche Inc.), interferon alpha (MULTIFERON® Viranative AB Corporation, OPC-18, Alfaferone, Alfanative, subalin), interferon alfacon-1 (Valeant), interferon alpha-n1 (Wellferon™, Glaxo Wellcome), interferon alpha-n3 (ALFERON®-Hemispherx Biopharma, Inc.), interferon-beta-1a (AVONEX® Biogen Idec, DL-8234 Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd), interferon-omega (omega DUROS®, Alza Corporation, Intarcia Therapeutics, Inc.; Biomed 510, Intarcia Therapeutics, Inc.), albinterferon alpha-2b (ALBUFERON®, Human Genome Sciences, Inc.), IFN alpha-2b XL, BLX-883 (LOCTERON®, Biolex Therapeutics, Inc.), DA-3021, interferon alpha-2b được glycosyl hoá (AVI-005), PEG-INFERGEN®, Amgen, Inc., interferon lamda-1 được PEG hoá (loại III) (IL-29 được PEG hoá), và BELEROFON®, Nautilus Biotech.

Thuật ngữ “liệu pháp kết hợp” nghĩa là chế phẩm hoặc phương pháp hoặc sử dụng hoặc dạng tương tự mà kết hợp hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp. Liệu pháp kết hợp có thể cũng bao gồm hoạt chất khác ngoài hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở: ribavirin, interferon, chất ức chế alpha-glucosidaza 1, chất bảo vệ gan (hepatoprotectant), chất chủ vận thụ thể giống Toll (TLR)-7, chất ức chế cyclophilin, chất ức chế xâm nhập của virus HCV, chất ức chế sự thành thực của HCV, và chất ức chế HCV IRES.

Thuật ngữ “hoạt chất” nghĩa là thành phần của liệu pháp kết hợp mà tạo ra hoặc có khả năng tạo ra tác dụng dược lý bao gồm hợp chất kết hợp bất kỳ, ribavirin, interferon, chất ức chế alpha-glucosidaza 1, chất bảo vệ gan, chất chủ vận TLR-7, chất ức chế cyclophilin, chất ức chế xâm nhập của virus HCV, chất ức chế sự thành thực của HCV, và chất ức chế HCV IRES.

Thuật ngữ “điều trị” và các thuật ngữ tương đương về mặt ngữ pháp của chúng, khi được sử dụng trong ngữ cảnh điều trị bệnh, nghĩa là làm chậm hoặc làm dừng sự tiến triển của bệnh, hoặc làm giảm ít nhất một triệu chứng của bệnh, tốt hơn nữa là làm giảm nhiều hơn một triệu chứng của bệnh. Ví dụ, người bệnh HCV có thể được cải thiện một hoặc tất cả các triệu chứng sau đây mà có thể là có liên quan đến bệnh nhiễm HCV: sự tăng lên của hàm lượng alanin aminotransferaza (ALT), sốt, nhức đầu, đau cơ, vàng da, mệt mỏi, mất cảm giác thèm ăn, buồn nôn, nôn và tiêu chảy. Việc điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan C có thể bao gồm việc làm giảm lượng virus HCV ở người bị nhiễm HCV.

Hợp chất nhất định được mô tả trong bản mô tả này có chứa một hoặc nhiều tâm không đối xứng, hoặc theo cách khác, có thể có khả năng tồn tại dưới dạng hỗn hợp các chất đồng phân lập thể. Phạm vi của sáng chế bao gồm hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể cũng như chất đồng phân đối ảnh được tinh chế hoặc hỗn hợp được làm giàu chất đồng phân đối ảnh/chất đồng phân không đối quang. Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm chất đồng phân cụ thể của hợp chất có công thức được thể hiện trong bản mô tả này, cũng như hỗn hợp được làm cân bằng một phần hoặc toàn bộ bất kỳ của chúng. Sáng chế cũng bao gồm chất đồng phân cụ thể của hợp chất có công thức được thể hiện trong bản mô tả này dưới dạng hỗn hợp với chất đồng phân của chúng trong đó một hoặc nhiều tâm không đối xứng được nghịch chuyển. Các định nghĩa và quy ước hóa học lập thể được sử dụng chung trong bản mô tả này theo tài liệu S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; và Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York.

Nhiều hợp chất hữu cơ tồn tại ở dạng quang hoạt, tức là, chúng có khả năng quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực phẳng. Để mô tả hợp chất có hoạt tính quang học, các tiền tố D và L hoặc R và S được sử dụng để biểu thị cấu trúc tuyệt đối của phân tử theo (các) tâm không đối xứng của nó. Các tiền tố D và L hoặc (+) và (-) được sử dụng để chỉ ký hiệu về sự quay của ánh sáng phân cực phẳng bởi hợp chất, với (-) hoặc L nghĩa là hợp chất này quay trái. Hợp chất có tiền tố (+) hoặc D thì quay phải.

Chất đồng phân lập thể cụ thể có thể còn được gọi là chất đồng phân đối ảnh, và hỗn hợp của các chất đồng phân này thường được gọi là hỗn hợp chất đồng phân đối ảnh. Hỗn hợp 50:50 của chất đồng phân đối ảnh được gọi là hỗn hợp triệt quang hoặc

chất triệt quang, mà có thể tồn tại trong đó không có sự chọn lọc lập thể hoặc tính đặc hiệu lập thể trong phản ứng hoặc quy trình hóa học. Thuật ngữ “hỗn hợp triệt quang” và “chất triệt quang” chỉ hỗn hợp đẳng mol của hai kiểu chất đồng phân đối ảnh, không có hoạt tính quang học.

Chế phẩm kết hợp

Sáng chế đề cập đến chế phẩm kết hợp chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp. Bảng I thể hiện chế phẩm kết hợp chứa hai thành phần (chế phẩm kết hợp 17), ba thành phần (các chế phẩm kết hợp 32-55), bốn thành phần (các chế phẩm kết hợp 62-91) và năm thành phần (các chế phẩm kết hợp 94-113) có thể có của hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 5, hợp chất 6, hợp chất 7 và hợp chất 10 được nêu dưới đây. Hợp chất 4, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16 là chất ức chế nucleosit của HCV NS5b polymeaza và chế phẩm kết hợp chứa các hợp chất kết hợp thông thường nhất là chỉ chứa một trong số các hợp chất 4, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16 (hợp chất 10 - xem cột 6 của bảng I).

Bảng I

		Hợp chất 1	Hợp chất 2	Hợp chất 3	Hợp chất 10	Hợp chất 5	Hợp chất 6	Hợp chất 7
Chế phẩm kết hợp	17				X		X	
Chế phẩm kết hợp	32	X			X		X	
Chế phẩm kết hợp	42		X		X		X	
Chế phẩm kết hợp	48			X	X		X	
Chế phẩm kết hợp	55				X		X	X
Chế phẩm kết hợp	62	X	X		X		X	
Chế phẩm kết hợp	68	X		X	X		X	
Chế phẩm kết hợp	73	X			X	X	X	
Chế phẩm kết hợp	75	X			X		X	X
Chế phẩm	78		X	X	X		X	

kết hợp								
Chế phẩm kết hợp	83		X		X	X	X	
Chế phẩm kết hợp	85		X		X		X	X
Chế phẩm kết hợp	87			X	X	X	X	
Chế phẩm kết hợp	89			X	X		X	X
Chế phẩm kết hợp	91				X	X	X	X
Chế phẩm kết hợp	94	X	X	X	X		X	
Chế phẩm kết hợp	99	X	X		X	X	X	
Chế phẩm kết hợp	101	X	X		X		X	X
Chế phẩm kết hợp	103	X		X	X	X	X	
Chế phẩm kết hợp	105	X		X	X		X	X
Chế phẩm kết hợp	107	X			X	X	X	X
Chế phẩm kết hợp	108		X	X	X	X	X	
Chế phẩm kết hợp	110		X	X	X		X	X
Chế phẩm kết hợp	112		X		X	X	X	X
Chế phẩm kết hợp	113			X	X	X	X	X

Chế phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ dược phẩm, trong đó chế phẩm này chứa hợp chất 6 và còn chứa hợp chất 10.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ dược phẩm, trong đó chế phẩm này chứa hợp chất 6 và còn chứa hợp chất 5 và hợp chất 10.

Muối

Các hợp chất kết hợp và các hoạt chất khác có thể là ở dạng muối. Thông thường, nhưng không hoàn toàn cần thiết, muối của hợp chất kết hợp và hoạt chất khác

là muối được dụng. Muối được bao hàm trong thuật ngữ "muối được dụng" dùng để chỉ muối không độc của hợp chất kết hợp và/hoặc hoạt chất khác. Ví dụ về muối được dụng thích hợp bao gồm muối cộng axit vô cơ như clorua, bromua, sulfat, phosphat, và nitrat; muối cộng axit hữu cơ như axetat, galactarat, propionat, suxinat, lactat, glycolat, malat, tartrat, xitrat, maleat, fumarat, metansulfonat, p-toluensulfonat, và ascorbat; muối với axit amin có tính axit như aspartat và glutamat; muối kim loại kiềm như muối natri và muối kali; muối kim loại kiềm thổ như muối magie và muối canxi; muối amoni; muối bazơ hữu cơ như muối trimetylamin, muối trietylamin, muối pyridin, muối picolin, muối dicyclohexylamin, và muối N,N'-dibenzyletylendiamin; và muối với axit amin có tính bazơ như muối lysin và muối arginin. Muối trong một số trường hợp có thể là hydrat hoặc etanol solvat.

Bào chế được phẩm

Các hợp chất kết hợp và/hoặc hoạt chất khác có thể được bào chế với chất mang hoặc tá dược thông thường, mà có thể được chọn theo phương thức thực hành thông thường. Viên nén thường có chứa tá dược, chất làm chảy, chất độn, chất kết dính và chất tương tự. Dược phẩm chứa nước có thể được bào chế ở dạng vô trùng, và khi dự định để đưa vào cơ thể bằng con đường khác không phải là qua đường miệng thì thường sẽ là đẳng trương. Tất cả các dược phẩm tùy ý có chứa tá dược như nêu trong tài liệu Handbook of Pharmaceutical Excipients (1986). Tá dược bao gồm axit ascorbic và chất chống oxy hóa khác, chất càn hóa như EDTA, cacbon hydrat như dextrin, hydroxyalkylxenluloza, hydroxyalkylmetylxenluloza, axit stearic và chất tương tự.

Độ pH của dược phẩm nằm trong khoảng từ khoảng 3 đến khoảng 11, nhưng thường là từ khoảng 7 đến 10.

Mặc dù thành phần hoạt tính có thể được sử dụng ở dạng riêng rẽ, nhưng tốt hơn là có thể bào chế một hoặc nhiều thành phần hoạt tính thành dạng dược phẩm. Dược phẩm theo sáng chế, để sử dụng cho thú y và cho người, chứa ít nhất một thành phần hoạt tính, cùng với một hoặc nhiều chất mang có thể chấp nhận được và tùy ý thành phần trị liệu khác. (Các) chất mang phải "có thể chấp nhận được" theo nghĩa là tương thích với các thành phần khác của dược phẩm và không độc hại về mặt sinh lý đối với đối tượng nhận chúng.

Dược phẩm bao gồm các dược phẩm thích hợp với các đường dùng được nêu dưới đây. Dược phẩm có thể thuận lợi nếu ở dạng liều đơn vị và có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực dược học. Kỹ thuật và phương pháp bào chế dược phẩm nói chung có thể được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Phương pháp này bao gồm bước kết hợp thành phần hoạt tính với chất mang mà tạo thành một hoặc nhiều thành phần phụ. Nhìn chung, dược phẩm có thể được điều chế bằng cách kết hợp đồng đều và nhuyển một hoặc nhiều thành phần hoạt tính với chất mang lỏng hoặc chất mang rắn được nghiền mịn hoặc cả hai, và sau đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế thích hợp để dùng qua đường miệng có thể ở dạng đơn vị rời rạc như viên nang, gói bột hoặc viên nén, trong đó mỗi đơn vị chứa lượng định trước của thành phần hoạt tính; dưới dạng bột hoặc hạt; dưới dạng dung dịch hoặc huyền phù dạng lỏng chứa nước hoặc không chứa nước; hoặc dưới dạng nhũ tương lỏng dầu-trong-nước hoặc nhũ tương lỏng nước-trong-dầu. Thành phần hoạt tính có thể cũng được sử dụng dưới dạng thuốc liều cao (bolus), thuốc tễ hoặc thuốc nhào.

Viên nén có thể được sản xuất bằng cách ép hoặc đúc, tùy ý với một hoặc nhiều thành phần phụ. Viên nén ép có thể được bào chế bằng cách ép trong máy thích hợp thành phần hoạt tính ở dạng chảy tự do như bột hoặc hạt, tùy ý được trộn với chất kết dính, chất làm trơn, chất pha loãng trợ, chất bảo quản, chất có hoạt tính bề mặt hoặc làm phân tán. Viên nén đúc có thể được sản xuất bằng cách đúc trong máy thích hợp hỗn hợp của thành phần hoạt tính dạng bột được làm ẩm bằng chất pha loãng trợ dạng lỏng. Viên nén có thể tùy ý được bao hoặc được tạo rãnh và tùy ý có thể được bào chế để mang lại sự giải phóng chậm hoặc có kiểm soát của thành phần hoạt tính.

Để sử dụng cho mắt hoặc mô bên ngoài khác, ví dụ, miệng và da, dược phẩm có thể tốt hơn nếu được dùng dưới dạng thuốc mỡ hoặc kem bôi tại chỗ chứa (các) thành phần hoạt tính với lượng, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,075 đến 20% khối lượng (bao gồm (các) thành phần hoạt tính với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 20%, với số gia là 0,1% khối lượng, như 0,6% khối lượng, 0,7% khối lượng, v.v.), tốt hơn nếu là từ 0,2 đến 15% khối lượng và tốt nhất nếu là từ 0,5 đến 10% khối lượng. Khi được bào chế thành dạng thuốc mỡ, thành phần hoạt tính có thể được sử dụng với nền thuốc mỡ parafin hoặc nền thuốc mỡ dễ trộn lẫn với nước. Theo cách khác, thành phần hoạt tính có thể được bào chế thành dạng kem với nền kem dầu-trong-nước.

Nếu muốn, pha nước của nền kem có thể bao gồm, ví dụ, ít nhất 30% khối lượng rượu đa chức, tức là, rượu có hai hoặc nhiều nhóm hydroxyl như propylen glycol, butan 1,3-diol, manitol, sorbitol, glyxerol và polyetylen glycol (bao gồm PEG 400) và hỗn hợp của chúng. Dược phẩm dùng tại chỗ có thể mong muốn là chứa hợp chất mà tăng cường mức độ hấp thu hoặc thẩm thấu của thành phần hoạt tính qua da hoặc diện tích bị ảnh hưởng khác. Ví dụ về các chất tăng cường thẩm thấu qua da bao gồm dimetyl sulphoxit và các chất tương tự có liên quan.

Pha dầu của nhũ tương của hợp chất kết hợp và/hoặc các thành phần hoạt tính khác có thể được tạo thành từ các thành phần đã biết theo cách đã biết. Mặc dù pha này có thể chỉ gồm chất nhũ hóa (còn được gọi là chất tạo nhũ), mong muốn là nó bao gồm hỗn hợp của ít nhất một chất nhũ hóa với chất béo hoặc dầu hoặc với cả chất béo và dầu. Tốt hơn nếu, chất nhũ hóa ưa nước có mặt cùng với chất nhũ hóa ưa chất béo mà đóng vai trò làm chất làm ổn định. Cũng được ưu tiên là bao gồm cả dầu và chất béo. Cùng với nhau, (các) chất nhũ hóa cùng với hoặc không cùng với (các) chất làm ổn định tạo thành sáp được gọi là sáp nhũ hoá, và sáp này cùng với dầu và chất béo tạo thành nền được gọi là nền thuốc mỡ nhũ hoá mà tạo thành pha phân tán trong dầu của dược phẩm dạng kem.

Chất nhũ hoá và chất làm ổn định nhũ tương thích hợp để sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm Tween® 60 (ICI Americas Inc.), Span 80, rượu cetostearylic, rượu benzylic, rượu myristylic, glyxeryl mono-stearat và natri lauryl sulfat.

Việc lựa chọn dầu hoặc chất béo thích hợp cho dược phẩm là dựa trên việc đạt được các tính chất mỹ phẩm mong muốn. Kem tốt hơn nếu là sản phẩm không nhờn, không biến màu và có thể rửa được với độ đặc thích hợp để tránh rò rỉ từ ống hoặc vật chứa khác. Este của alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, mono- hoặc dibazơ như di-isoadipat, isoxetyl stearat, propylen glycol dieste của axit béo từ dầu dừa, isopropyl myristat, dexyl oleat, isopropyl palmitat, butyl stearat, 2-ethylhexyl palmitat hoặc hỗn hợp pha trộn của các este mạch nhánh đã biết như Crodamol CAP có thể được sử dụng, trong đó ba chất cuối là các este được ưu tiên. Chúng có thể được sử dụng ở dạng riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp tùy thuộc vào các tính chất cần thiết. Theo cách khác, lipid có nhiệt độ nóng chảy cao như parafin mềm màu trắng và/hoặc parafin lỏng hoặc dầu khoáng khác có thể được sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều hoạt chất cùng với một hoặc nhiều chất mang hoặc tá dược được dụng và tùy ý với các chất trị liệu khác. Dược phẩm chứa thành phần hoạt tính có thể là ở dạng bất kỳ thích hợp cho phương pháp sử dụng dự định. Khi được sử dụng để dùng qua đường miệng ví dụ, viên nén, thuốc viên, thuốc hình thoi, huyền phù trong nước hoặc dầu, bột hoặc hạt dễ phân tán, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, sirô hoặc cốm ngọt có thể được bào chế. Dược phẩm được dự định để dùng qua đường miệng có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bào chế dược phẩm và dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều chất bao gồm chất làm ngọt, chất tạo hương, chất tạo màu và chất bảo quản, để tạo ra dược phẩm có mùi vị dễ chịu. Viên nén chứa thành phần hoạt tính trong hỗn hợp với tá dược được dụng không độc mà thích hợp để bào chế viên nén là có thể chấp nhận được. Tá dược này có thể là, ví dụ, chất pha loãng trợ, như canxi hoặc natri cacbonat, lactoza, lactoza monohydrat, croscarmelloza natri, povidon, canxi hoặc natri phosphat; chất tạo hạt và gây rã, như tinh bột ngô, hoặc axit alginic; chất kết dính, như xenluloza, xenluloza dạng vi tinh thể, tinh bột, gelatin hoặc acacia; và chất làm trơn, như magie stearat, axit stearic hoặc bột tal. Viên nén có thể không được bao hoặc có thể được bao bằng kỹ thuật đã biết bao gồm kỹ thuật bao vi nang để làm chậm sự tan rã và sự hấp thụ trong dải dạ dày-ruột non và nhờ đó tạo ra tác dụng kéo dài trong thời gian lâu hơn. Ví dụ, nguyên liệu để tạo ra tác dụng làm chậm kéo dài thời gian tác dụng như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với sáp có thể được sử dụng.

Dược phẩm để dùng qua đường miệng có thể còn ở dạng viên nang cứng trong đó (các) thành phần hoạt tính được trộn với chất pha loãng trợ dạng rắn, ví dụ canxi phosphat hoặc cao lanh, hoặc ở dạng viên nang gelatin mềm trong đó thành phần hoạt tính được trộn với môi trường nước hoặc dầu, như dầu lạc, parafin lỏng hoặc dầu ô liu.

Huyền phù trong nước theo sáng chế có chứa thành phần hoạt tính trong hỗn hợp với tá dược thích hợp để sản xuất huyền phù trong nước. Tá dược này bao gồm chất tạo huyền phù, như natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, hydroxypropyl metyloxenluloza, natri alginat, polyvinylpyrrolidon, gôm tragacan và gôm acacia, và chất làm phân tán hoặc thấm ướt như phosphatit tự nhiên (ví dụ, lexitin), sản phẩm ngưng tụ của alkylen oxit với axit béo (ví dụ, polyoxyetylen stearat), sản phẩm ngưng tụ của etylen oxit với rượu béo mạch dài (ví dụ, heptadecaetylenoxyxetanol), sản phẩm

ngưng tụ của etylen oxit với este một phần thu được từ axit béo và hexitol anhydrit (ví dụ, polyoxyetylen sorbitan monooleat). Huyền phù trong nước có thể còn chứa một hoặc nhiều chất bảo quản như etyl hoặc n-propyl p-hydroxy-benzoat, một hoặc nhiều chất tạo màu, một hoặc nhiều chất tạo hương và một hoặc nhiều chất làm ngọt, như sucroza hoặc sacarin.

Huyền phù trong dầu có thể được bào chế bằng cách tạo huyền phù thành phần hoạt tính trong dầu thực vật, như dầu lạc, dầu ô liu, dầu vừng hoặc dầu dừa, hoặc trong dầu khoáng như parafin lỏng. Huyền phù dùng qua đường miệng có thể có chứa chất làm đặc, như sáp ong, parafin cứng hoặc rượu xetylic. Chất làm ngọt, như các chất được nêu trong bản mô tả này, và chất tạo hương có thể được bổ sung để tạo ra được phẩm dùng qua đường miệng có mùi vị dễ chịu. Dược phẩm có thể được bảo quản bằng cách bổ sung chất chống oxy hóa như axit ascorbic.

Bột và hạt dễ phân tán theo sáng chế thích hợp để bào chế huyền phù trong nước bằng cách bổ sung nước tạo ra thành phần hoạt tính trong hỗn hợp với chất làm phân tán hoặc thấm ướt, chất tạo huyền phù, và một hoặc nhiều chất bảo quản. Ví dụ về chất làm phân tán hoặc thấm ướt và chất tạo huyền phù thích hợp là các chất như nêu trên. Tá dược bổ sung, ví dụ chất làm ngọt, chất tạo hương và chất tạo màu, cũng có thể có mặt.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn ở dạng nhũ tương dầu-trong-nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật, như dầu ô liu hoặc dầu lạc, dầu khoáng, như parafin lỏng, hoặc hỗn hợp của chúng. Chất nhũ hoá thích hợp bao gồm gồm tự nhiên, như gồm acacia và gồm tragacan, phosphatit tự nhiên, như lexitin đậu tương, este hoặc este một phần thu được từ axit béo và hexitol anhydrit, như sorbitan monooleat, và sản phẩm ngưng tụ của este một phần này với etylen oxit, như polyoxyetylen sorbitan monooleat. Nhũ tương có thể còn chứa chất làm ngọt và chất tạo hương. Sirô và cồn ngọt có thể được bào chế với chất làm ngọt, như glyxerol, sorbitol hoặc sucroza. Dược phẩm này có thể còn chứa chất làm dịu, chất bảo quản, chất tạo hương và chất tạo màu.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng dược phẩm tiêm vô trùng, như huyền phù tiêm vô trùng trong nước hoặc dầu. Huyền phù này có thể được bào chế như đã biết trong lĩnh vực bằng cách sử dụng chất làm phân tán hoặc thấm ướt và chất tạo

huyền phù thích hợp mà đã được nêu trong bản mô tả này. Dược phẩm tiêm vô trùng cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù tiêm vô trùng trong chất làm loãng hoặc dung môi không độc có thể chấp nhận được để dùng ngoài đường tiêu hóa, như dung dịch trong 1,3-butan-diol hoặc được bào chế dưới dạng bột đông khô. Trong số đó, các tá dược dẫn thuốc và dung môi có thể chấp nhận được mà có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng có thể thường được sử dụng dưới dạng dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù. Nhằm mục đích này, dầu không bay hơi có tác dụng làm dịu bất kỳ có thể được sử dụng, bao gồm mono- hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, axit béo như axit oleic có thể cũng được sử dụng để bào chế thuốc tiêm.

Lượng thành phần hoạt tính mà có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dược phẩm dạng liều đơn vị sẽ thay đổi tùy thuộc vào vật chủ được điều trị và phương thức sử dụng cụ thể. Ví dụ, dược phẩm giải phóng theo thời gian được dự định để dùng qua đường miệng cho người có thể chứa khoảng từ 1 đến 1000 mg nguyên liệu hoạt tính được kết hợp với lượng thích hợp và thuận tiện của nguyên liệu chất mang mà có thể thay đổi trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 95% tổng khối lượng của dược phẩm (khối lượng:khối lượng). Dược phẩm có thể được bào chế để tạo ra lượng có thể đo được dễ dàng để sử dụng. Ví dụ, dung dịch trong nước được dự định để truyền qua tĩnh mạch có thể chứa từ khoảng 3 đến 500 μg thành phần hoạt tính trong mỗi ml dung dịch để có thể thực hiện việc truyền thể tích thích hợp ở tốc độ khoảng 30 mL/giờ.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng cho mắt bao gồm thuốc nhỏ mắt trong đó thành phần hoạt tính được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong chất mang thích hợp, cụ thể là dung môi chứa nước cho thành phần hoạt tính. Thành phần hoạt tính tốt hơn nếu có mặt trong dược phẩm này ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20%, có lợi nếu từ 0,5 đến 10%, cụ thể là khoảng 1,5% khối lượng.

Dược phẩm thích hợp để dùng tại chỗ trong miệng bao gồm thuốc hình thoi chứa thành phần hoạt tính trong nền đã được tạo hương, thường là sucroza và acacia hoặc tragacan; viên ngậm chứa thành phần hoạt tính trong nền tro như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và acacia; và nước súc miệng chứa thành phần hoạt tính trong chất mang lỏng thích hợp.

Dược phẩm để dùng qua đường trực tràng có thể ở dạng viên đạn với nền thích hợp, bao gồm, ví dụ bơ cacao hoặc salixilat.

Dược phẩm thích hợp để dùng trong phổi hoặc qua đường mũi có cỡ hạt, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 500 μm (bao gồm cỡ hạt nằm trong khoảng từ 0,1 và 500 μm với số gia như 0,5 μm , 1 μm , 30 μm , 35 μm , v.v.), mà được sử dụng bằng cách xông hít nhanh qua đường mũi hoặc bằng cách xông hít theo đường miệng để vào túi phế nang. Dược phẩm thích hợp bao gồm dung dịch trong nước hoặc dầu của thành phần hoạt tính. Dược phẩm thích hợp để dùng bằng khí dung hoặc bột khô có thể được bào chế theo các phương pháp thông thường và có thể được đưa vào cơ thể cùng với các chất trị liệu khác như hợp chất trên đây được sử dụng trong điều trị hoặc điều trị dự phòng sự nhiễm bệnh như được nêu trong bản mô tả này.

Dược phẩm thích hợp để dùng qua âm đạo có thể ở dạng thuốc đặt âm đạo, nút thấm (tampon), kem bôi, gel, thuốc nhão, bột hoặc dược phẩm phun mà ngoài thành phần hoạt tính còn chứa chất mang như đã biết trong lĩnh vực là thích hợp.

Dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm hãm vi khuẩn và chất tan mà làm cho dược phẩm đẳng trương với máu của đối tượng nhận dự định; và huyền phù vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể bao gồm chất tạo huyền phù và chất làm đặc. Dược phẩm có thể được chứa trong vật chứa đơn liều hoặc đa liều, ví dụ ống thuốc tiêm và lọ nhỏ được bịt kín, và có thể được lưu giữ trong điều kiện đã được làm khô lạnh (đông khô) chỉ cần bổ sung chất mang lỏng vô trùng, ví dụ nước để tiêm, ngay trước khi sử dụng. Dung dịch và huyền phù tiêm tuý ứng có thể được bào chế từ bột, hạt và viên nén vô trùng thuộc loại được mô tả trên đây. Dược phẩm dạng liều đơn vị được ưu tiên có thể là dược phẩm chứa thành phần hoạt tính với liều hằng ngày hoặc phân liều đơn vị hằng ngày, như nêu trên, hoặc một phần thích hợp của chúng.

Cần hiểu rằng ngoài các thành phần đã được đề cập cụ thể ở trên, dược phẩm chứa hợp chất kết hợp và/hoặc các thành phần hoạt tính khác có thể bao gồm chất khác thông dụng trong lĩnh vực liên quan đến loại dược phẩm này, ví dụ chất thích hợp để dùng qua đường miệng có thể bao gồm chất tạo hương.

Hợp chất kết hợp và các thành phần hoạt tính khác cũng có thể được bào chế để làm cho thành phần hoạt tính giải phóng có kiểm soát để cho phép dùng liều lượng ít thường xuyên hơn hoặc để cải thiện đặc điểm dược động học hoặc độc tính của thành phần hoạt tính. Do đó, sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp được bào chế để giải phóng kéo dài hoặc có kiểm soát.

Liều lượng

Liều lượng hữu hiệu của thành phần hoạt tính ít nhất là phụ thuộc vào bản chất của tình trạng bệnh cần điều trị, độc tính, việc hợp chất được sử dụng để phòng bệnh (liều lượng thấp hơn) hay để chống lại tình trạng bệnh hoặc bệnh đang hoạt động, phương pháp đưa vào cơ thể, và dạng dược phẩm, và có thể được xác định bởi bác sĩ lâm sàng bằng cách sử dụng các nghiên cứu điều chỉnh liều lượng thông thường.

Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, viên nén) có thể được bào chế để tạo ra liều lượng hữu hiệu. Ví dụ, đối với hợp chất 1 hoặc muối được dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 1,0 mg đến 100 mg, từ 5 mg đến 40 mg, từ 30 mg đến 50 mg, hoặc 20 mg hoặc 40 mg và có thể được làm thích ứng để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 6, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16. Đối với hợp chất 2 hoặc muối được dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 25 mg đến 800 mg, từ 50 mg đến 400 mg, hoặc từ 60 mg đến 300 mg hoặc từ 70 mg đến 200 mg hoặc có thể là 150 mg và có thể được làm thích ứng để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 1, hợp chất 3, hợp chất 6, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16. Đối với hợp chất 3 hoặc muối được dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 10 mg đến 1000 mg, hoặc 50 đến 400 mg, hoặc 100 mg đến 400 mg hoặc 200 mg đến 400 mg và có thể được làm thích ứng để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 6, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16. Đối với hợp chất 4 hoặc muối được dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 25 mg đến 400 mg hoặc từ 25 mg đến 200 mg có thể được làm thích ứng

để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 6, hợp chất 5 và hợp chất 7. Đối với hợp chất 5 hoặc muối dược dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 50 mg đến 1000 mg hoặc 100 mg đến 750 mg có thể được làm thích ứng để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 6, hợp chất 4, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16. Đối với hợp chất 6 hoặc muối dược dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 1mg đến 500 mg hoặc từ 3 mg đến 300 mg hoặc từ 3 mg đến 200 mg hoặc từ 3 mg đến 100 mg hoặc từ 10 mg đến 90 mg hoặc từ 30 mg đến 90 mg có thể được làm thích ứng để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16. Đối với hợp chất 7 hoặc muối dược dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa từ 100 microgam lên đến 3000 mg, từ 25 mg lên đến 2000 mg, hoặc từ 50 mg lên đến 1000 mg và có thể được làm thích ứng để sử dụng một hoặc nhiều lần một ngày (ví dụ bốn lần một ngày) cho người cần chúng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất bất kỳ trong số hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 6, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16. Đối với hợp chất 9 và hợp chất 10 hoặc muối dược dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa 10 mg đến 1000 mg một ngày (theo US 2010/0298257). Đối với hợp chất 11 hoặc muối dược dụng của chúng, chế phẩm có thể chứa 1 mg đến 1000 mg một ngày (theo US 2010/0081628). Liều lượng của các hợp chất 1-7 mà được sử dụng cùng nhau có thể cần được điều chỉnh trên cơ sở xem xét mức tương tác thuốc-thuốc có thể có. Ví dụ, mặc dù hợp chất 1 dường như không ảnh hưởng đến hệ chuyển hoá thuốc, tuy nhiên hợp chất 2 dường như có tác dụng làm tăng mức tiếp xúc của hợp chất 1 khoảng 2-3 lần (2-3X). Do đó, cần giảm liều lượng (ví dụ 2x-3x) của hợp chất 1 trước khi hợp chất 1 được kết hợp với hợp chất 2. Khi kết hợp với hợp chất 16, hợp chất 2 dường như có tác dụng làm tăng mức tiếp xúc của hợp chất 6 khoảng 5x, do đó cần giảm liều lượng (ví dụ 3x-5x) của hợp chất 16 trước khi hợp chất 16 được định liều

với hợp chất 2. Do đó, liều lượng 10 mg của hợp chất 6 khi được sử dụng cùng với hợp chất 2 sẽ xấp xỉ với liều lượng 30 mg.

Hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp có thể được sử dụng kết hợp với ribavirin với lượng khoảng 800 mg, 1000 mg hoặc 1200 mg một ngày ở dạng đơn liều hoặc đa liều (ví dụ khoảng 400 mg, 500 mg hoặc 600 mg hai lần một ngày).

Sử dụng chế phẩm kết hợp theo sáng chế

Khi thực hành khía cạnh này của sáng chế, hợp chất kết hợp có thể được sử dụng ở liều lượng được nêu ở trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến hợp chất 10 để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh nhiễm HCV, trong đó hợp chất 10 này được sử dụng kết hợp với hợp chất 6.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến hợp chất 10 để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh nhiễm HCV, trong đó hợp chất 10 này được sử dụng kết hợp với hợp chất 5 và hợp chất 6.

Đường dùng và phương thức sử dụng

Hai hoặc nhiều hợp chất 1, hợp chất 2, hợp chất 3, hợp chất 4, hợp chất 5, hợp chất 6, hợp chất 7, hợp chất 9, hợp chất 10, hợp chất 11, hợp chất 12, hợp chất 13, hợp chất 14, hợp chất 15 và hợp chất 16 và thành phần khác bất kỳ của liệu pháp kết hợp có thể được làm thích ứng để sử dụng bằng đường dùng bất kỳ thích hợp với tình trạng bệnh cần được điều trị. Đường dùng thích hợp bao gồm miệng, trực tràng, mũi, tại chỗ (bao gồm má và dưới lưỡi), âm đạo và ngoài đường tiêu hóa (bao gồm dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong thủy mạc và trên màng cứng) và đường dùng tương tự. Cần hiểu rằng đường dùng được ưu tiên có thể thay đổi, ví dụ, theo tình trạng bệnh của đối tượng nhận.

Tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi các thành phần hoạt tính: (1) được bào chế cùng nhau (ví dụ ở dạng liều đơn vị) và được sử dụng hoặc được đưa vào cơ thể một cách đồng thời trong chế phẩm kết hợp; (2) được đưa vào cơ thể theo cách luân phiên hoặc đồng thời dưới dạng các chế phẩm riêng rẽ; hoặc (3) theo chế độ nào đó khác. Khi được đưa vào cơ thể theo liệu pháp luân phiên, tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi các hợp chất được sử dụng hoặc được đưa vào cơ thể một cách tuần tự, ví

dụ, trong các viên nén, viên tròn hoặc viên nang riêng rẽ, hoặc bằng các lần tiêm khác nhau trong các xi lanh riêng rẽ. Nhìn chung, trong liệu pháp luân phiên, liều lượng hữu hiệu của mỗi thành phần hoạt tính được sử dụng tuần tự, tức là, theo thứ tự, trong khi đó trong liệu pháp kết hợp, liều lượng hữu hiệu của hai hoặc nhiều thành phần hoạt tính được sử dụng cùng với nhau.

Việc sử dụng đồng thời hợp chất kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất kết hợp thường dùng để chỉ việc sử dụng đồng thời hoặc tuần tự một hoặc nhiều hợp chất kết hợp, sao cho lượng hữu hiệu để điều trị của hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp có mặt trong cơ thể của người bệnh. Trong một số trường hợp, các hợp chất kết hợp (ví dụ hai, ba hoặc bốn hợp chất kết hợp) được bào chế cùng nhau để cho phép dùng cùng lúc. Trong một số trường hợp, các hợp chất kết hợp đã được bào chế cùng nhau có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều hợp chất kết hợp bổ sung.

Việc sử dụng đồng thời cũng bao gồm việc sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp trước hoặc sau khi sử dụng liều đơn vị của một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác, ví dụ, sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp trong một khoảng thời gian tính theo giây, phút, hoặc giờ sử dụng một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác. Ví dụ, liều đơn vị của hợp chất kết hợp có thể được sử dụng trước tiên, sau đó trong một khoảng thời gian tính theo giây hoặc phút, sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp thứ hai, sau đó trong một khoảng thời gian tính theo giây hoặc phút, sử dụng liều đơn vị của một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác. Theo cách khác, liều đơn vị của một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác có thể được sử dụng trước tiên, sau đó trong một khoảng thời gian tính theo giây hoặc phút, sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp, sau đó trong một khoảng thời gian tính theo giây hoặc phút, sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp thứ hai. Trong một số trường hợp, có thể mong muốn sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp trước tiên, sau đó, sau một khoảng thời gian tính theo giờ (ví dụ, 1-12 giờ), sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp thứ hai, sau đó, sau một khoảng thời gian tính theo giờ (ví dụ, 1-12 giờ), sử dụng liều đơn vị của một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác. Trong các trường hợp khác, có thể mong muốn sử dụng liều đơn vị của một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác trước tiên, sau đó, sau một khoảng thời gian tính theo giờ (ví dụ, 1-12 giờ), sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp, sau đó, sau một khoảng thời gian tính theo giờ (ví dụ, 1-12 giờ), sử dụng liều đơn vị của hợp chất kết hợp thứ hai. Khi ba hoặc nhiều hợp chất kết hợp được sử dụng

với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung, các hợp chất kết hợp này có thể được sử dụng theo cách hợp chất này sau hợp chất khác trong một khoảng thời gian tính theo giây, phút, hoặc giờ (ví dụ 1-12 giờ) và một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung có thể được sử dụng trước, trong hoặc sau khi sử dụng các hợp chất kết hợp này. Khi các hợp chất kết hợp được bào chế cùng nhau, chúng có thể được sử dụng đồng thời, hoặc trước hoặc sau khi sử dụng một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung.

Trừ khi có quy định khác, liệu pháp kết hợp có thể được sử dụng dưới dạng liều lượng riêng rẽ với mỗi thành phần hoạt tính, được sử dụng cùng với nhau hoặc theo cách riêng rẽ, tuần tự hoặc đồng thời, và vào thời gian gần nhau hoặc vào thời gian xa nhau.

Giai đoạn điều trị có thể kéo dài, ví dụ, từ khoảng 12 tuần đến khoảng 48 tuần, hoặc lâu hơn, ví dụ, từ khoảng 12 tuần đến khoảng 24 tuần.

Sáng chế bao gồm chế phẩm kết hợp chứa các thành phần hữu hiệu để điều trị để cải thiện ít nhất một triệu chứng của bệnh nhiễm HCV ở người bao gồm, nhưng không giới hạn ở, buồn nôn, nôn, mất cảm giác thèm ăn, mệt mỏi, vàng da, nôn, tiêu chảy, mất nước, đau bụng, xơ gan. Ngoài ra, ở một số cá thể bị nhiễm HCV, việc sử dụng liệu pháp kết hợp là hữu hiệu để làm giảm lượng các hạt virus HCV có mặt trong cơ thể của người bị nhiễm một lượng có ý nghĩa về mặt thống kê. Lượng virus có thể được đo, ví dụ, bằng cách đo hàm lượng ARN của HCV trong huyết tương bằng cách sử dụng, ví dụ, thử nghiệm COBAS TaqMan HCV (Roche Molecular Systems). Thông thường, người bị nhiễm HCV mà được điều trị bằng hợp chất kết hợp theo sáng chế được cải thiện một hoặc tất cả các triệu chứng có liên quan đến bệnh nhiễm HCV. Chế phẩm kết hợp chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp với ribavirin không phải interferon

Như được mô tả trên đây, một số phương pháp điều trị HCV hiện nay bao gồm việc sử dụng interferon, nhưng phương pháp điều trị này thường tạo ra tác dụng phụ không mong muốn. Do đó, mong muốn tìm ra phương pháp điều trị HCV hữu hiệu mà không cần dùng interferon.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm, mô tả ứng dụng, phương pháp và đối tượng tương tự khác để điều trị HCV bao gồm bước sử dụng hai hoặc

nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, không sử dụng một hoặc nhiều interferon. Khía cạnh này của sáng chế có thể là đặc biệt hữu dụng vì nó cho phép điều trị HCV hiệu quả mà không có tác dụng phụ liên quan đến việc sử dụng một hoặc nhiều interferon.

Theo một phương án của sáng chế, lượng kết hợp của ribavirin và hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, tùy ý với một hoặc nhiều chất bổ sung, là hữu hiệu để điều trị bệnh nhiễm HCV.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh nhiễm HCV ở người bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không sử dụng đồng thời một hoặc nhiều interferon. Liên quan đến khía cạnh này, sáng chế không loại trừ khả năng dùng liều lượng của một hoặc nhiều interferon. Cụ thể hơn, sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với phương pháp trị liệu khác, mà thực tế bao gồm một hoặc nhiều interferon. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị HCV hiệu quả bằng ribavirin mà không cần một hoặc nhiều interferon.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm lượng virus ở người được chẩn đoán nhiễm HCV bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là một hoặc nhiều interferon.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị HCV ở đối tượng người về cơ bản bao gồm việc sử dụng ribavirin kết hợp với hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm sự xuất hiện của chủng HCV biến đổi có tính kháng đối với các chất kháng virus được sử dụng đồng thời qua đường miệng bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không sử dụng đồng thời một hoặc nhiều interferon.

Tương tự, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, ví dụ được phẩm để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh nhiễm HCV ở người chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là với một hoặc nhiều interferon. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập

đến chế phẩm để làm giảm lượng virus ở người được chẩn đoán nhiễm HCV chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là một hoặc nhiều interferon. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị HCV ở đối tượng người mà về cơ bản chứa ribavirin ở dạng kết hợp với hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị HCV dựa trên ribavirin chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, với điều kiện là chế phẩm này không chứa một hoặc nhiều interferon. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm để làm giảm sự xuất hiện của chủng HCV biến đổi có tính kháng đối với các chất kháng virus được sử dụng đồng thời qua đường miệng, chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là với một hoặc nhiều interferon.

Tương tự, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là với một hoặc nhiều interferon, trong việc sản xuất thuốc để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh nhiễm HCV ở người; cũng như việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là một hoặc nhiều interferon, trong việc sản xuất thuốc để làm giảm lượng virus ở người được chẩn đoán nhiễm HCV; cũng như việc sử dụng ribavirin kết hợp với hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng trong việc sản xuất thuốc để điều trị HCV ở đối tượng người, trong đó việc sử dụng này không bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều interferon; cũng như việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng trong việc sản xuất thuốc để điều trị HCV dựa trên ribavirin, trong đó việc sử dụng này không cần phải sử dụng một hoặc nhiều interferon; cũng như việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, mà không phải là với một hoặc nhiều interferon, trong việc sản xuất thuốc để làm giảm sự xuất hiện của chủng HCV biến đổi có tính kháng đối với các chất kháng virus được sử dụng đồng thời qua đường miệng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kết hợp chứa ribavirin và hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, mà chế phẩm kết hợp này về cơ bản không chứa một hoặc nhiều interferon. Theo một phương án, chế phẩm kết hợp có thể ở dạng liều lượng riêng rẽ với mỗi thành phần hoạt tính, được sử

dùng cùng với nhau hoặc riêng rẽ, tuần tự hoặc đồng thời, và vào thời gian gần nhau hoặc vào thời gian xa nhau.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến bộ kit bao gồm ribavirin, hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp và hướng dẫn sử dụng về chế độ điều trị để điều trị, làm giảm lượng virus, hoặc làm chậm sự khởi phát hoặc sự tiến triển HCV, trong đó chế độ điều trị bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp và ribavirin, mà không sử dụng một hoặc nhiều interferon. Theo một phương án, bộ kit này có thể cũng bao gồm bao gói, như vỉ phòng. Theo cách khác, bộ kit này có thể cung cấp quy định và cách dùng liều lượng riêng rẽ của mỗi thành phần dưới dạng dược chất được đóng gói riêng rẽ, nhưng khi được kết hợp với hướng dẫn sử dụng về chế độ điều trị để điều trị, làm giảm lượng virus, hoặc làm chậm sự khởi phát hoặc sự tiến triển HCV, thì cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa ribavirin; hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối dược dụng của chúng và một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Theo một phương án, dược phẩm có thể là dạng liều đơn vị.

Trừ khi có quy định khác, liệu pháp kết hợp với ribavirin có thể được sử dụng dưới dạng liều lượng riêng rẽ với mỗi thành phần hoạt tính được sử dụng (bao gồm hợp chất kết hợp), có thể được sử dụng cùng nhau (ví dụ, dưới dạng liều đơn vị, như viên nén) hoặc theo cách riêng rẽ, tuần tự hoặc đồng thời, và vào thời gian gần nhau hoặc vào thời gian xa nhau. Nếu được sử dụng theo cách riêng rẽ, mỗi hợp chất có thể được sử dụng với (các) hợp chất khác cùng lúc, hoặc trước hoặc sau khi sử dụng (các) hợp chất khác. Các thành phần hoạt tính có thể được sử dụng hằng ngày. Theo một phương án, liều lượng hằng ngày của các thành phần hoạt tính được sử dụng trong các phân liều riêng rẽ, như một, hai, ba hoặc bốn lần một ngày. Có lợi nếu, liều lượng hằng ngày của hợp chất kết hợp hoặc muối dược dụng của chúng và ribavirin có thể được sử dụng một lần một ngày.

Mặc dù sáng chế bao gồm chế phẩm, và mô tả ứng dụng, phương pháp và đối tượng tương tự khác để điều trị HCV bao gồm bước sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối dược dụng của chúng; và ribavirin, mà không phải là một hoặc nhiều interferon, tuy nhiên sáng chế không loại trừ khả năng sử dụng liều lượng của một hoặc nhiều interferon cho người. Cụ thể hơn, sáng chế có thể được sử dụng kết

hợp với phương pháp trị liệu khác cho chỉ định khác, mà thực tế bao gồm một hoặc nhiều interferon.

Chế phẩm kết hợp chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp với ribavirin và interferon

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm, và mô tả ứng dụng, phương pháp và đối tượng tương tự khác bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng và ribavirin, và một hoặc nhiều interferon để điều trị HCV. Việc sử dụng nhiều interferon hơn có thể có mối quan hệ về mặt thời gian với việc sử dụng hợp chất kết hợp và ribavirin.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh nhiễm HCV ở người bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, ribavirin, và một hoặc nhiều interferon. Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm lượng virus ở người được chẩn đoán nhiễm HCV bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng cùng với ribavirin và một hoặc nhiều interferon.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị HCV dựa trên ribavirin bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng cùng với ribavirin, và một hoặc nhiều interferon.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm sự xuất hiện của chủng HCV biến đổi có tính kháng đối với các chất kháng virus được sử dụng đồng thời qua đường miệng bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng cùng với ribavirin và một hoặc nhiều interferon.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng cùng với ribavirin và một hoặc nhiều interferon, trong việc sản xuất thuốc để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh nhiễm HCV ở người. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng cùng với ribavirin và một hoặc nhiều interferon, trong việc sản xuất thuốc để làm giảm lượng virus ở người được chẩn đoán nhiễm HCV. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ribavirin kết hợp với hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng trong việc sản xuất thuốc để điều trị HCV ở đối tượng người, trong đó việc sử dụng này bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều interferon. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả

việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng trong việc sản xuất thuốc để điều trị HCV dựa trên ribavirin, trong đó việc sử dụng bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều interferon. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, ribavirin, và một hoặc nhiều interferon trong việc sản xuất thuốc để làm giảm sự xuất hiện của chủng HCV biến đổi có tính kháng đối với các chất kháng virus được sử dụng đồng thời qua đường miệng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm kết hợp chứa ribavirin và hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, mà chế phẩm kết hợp này chứa một hoặc nhiều interferon.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến bộ kit bao gồm ribavirin, hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp và một hoặc nhiều interferon; và các hướng dẫn sử dụng về chế độ điều trị để điều trị, làm giảm lượng virus, hoặc làm chậm sự khởi phát hoặc sự tiến triển HCV trong đó chế độ điều trị bao gồm việc sử dụng hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp và ribavirin và sử dụng một hoặc nhiều interferon. Theo một phương án, bộ kit này có thể cũng bao gồm bao gói, như vỉ phòng. Theo cách khác, bộ kit này có thể cung cấp quy định và cách dùng liều lượng riêng rẽ của mỗi thành phần dưới dạng được chất được đóng gói riêng rẽ, nhưng khi được kết hợp với hướng dẫn sử dụng về chế độ điều trị để điều trị, làm giảm lượng virus, hoặc làm chậm sự khởi phát hoặc sự tiến triển HCV, thì cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp hoặc muối được dụng của chúng, ribavirin, và một hoặc nhiều interferon; và một hoặc nhiều chất mang được dụng. Theo một phương án, dược phẩm có thể là dạng liều đơn vị.

Trừ khi có quy định khác, liệu pháp kết hợp với ribavirin và một hoặc nhiều interferon có thể được sử dụng dưới dạng liều lượng riêng rẽ với một hoặc nhiều interferon được sử dụng cho người bệnh và mỗi trong số các thành phần hoạt tính còn lại được sử dụng trong liệu pháp kết hợp (bao gồm hợp chất kết hợp) được sử dụng cùng với nhau (ví dụ, dưới dạng liều đơn vị, như viên nén) hoặc theo cách riêng rẽ, tuần tự hoặc đồng thời, và vào thời gian gần nhau hoặc vào thời gian xa nhau. Nếu được sử dụng theo cách riêng rẽ, mỗi thành phần hoạt tính có thể được sử dụng với

(các) thành phần khác cùng lúc, hoặc trước hoặc sau khi dùng (các) thành phần khác. Các thành phần hoạt tính có thể được sử dụng hằng ngày. Theo một phương án, liều lượng hằng ngày được sử dụng trong các phân liều riêng rẽ, như một, hai, ba hoặc bốn lần một ngày.

Liệu pháp kết hợp, bao gồm chất trị liệu bổ sung

Theo một phương án khác, ví dụ về chế phẩm kết hợp thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chế phẩm kết hợp chứa hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung bao gồm chất ức chế proteaza NS3 HCV, chất ức chế alpha-glucosidaza 1, chất bảo vệ gan, chất ức chế nucleosit hoặc nucleotit của HCV NS5B polymeaza, chất ức chế không nucleosit của HCV NS5B polymeaza, chất ức chế HCV NS5A, chất chủ vận TLR-7, chất ức chế cyclophilin, chất ức chế HCV IRES, chất ức chế xâm nhập của HCV, chất ức chế sự thành thực của HCV, chất ức chế lắp ráp HCV, chất ức chế khả năng lây nhiễm HCV và chất cải thiện được động học, cũng như thuốc khác để điều trị HCV. Cụ thể hơn, hai hoặc nhiều hợp chất kết hợp theo sáng chế có thể được kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) Chất ức chế HCV NS3 proteaza, ví dụ, boceprevir (SCH-503034, SCH-7), telaprevir (VX-950), TMC-435 (IUPAC N-[(2R,3aR,10Z,11aS,12aR,14aR)-2-[2-(4-isopropylthiazol-2-yl)-7-methoxy-8-methylquinolin-4-yl]-5-methyl-4,14-dioxo-1,2,3,3a,4,5,6,7,8,9,11a,12,12a,13,14,14a-hexadecahydroxyclopenta[c]cyclopropa[g][1,6]diazaxyclo-tetradexin-12a-ylcarbonyl]cyclopropansulfonamid], ABT-450, ACH-1625, ACH-2684, BI-201335, BI-1230, MK-5172, MK-7009, SCH-900518, VBY-376, VX-500, GS-9256, GS-9451, BMS-605339, PHX-1766, AS-101, YH-5258, YH-5530, YH-5531, và ITMN-191 (R-7227);
- (ii) chất ức chế alpha-glucosidaza 1, ví dụ, celgosivir (MX-3253), UT-231B, Miglitol;
- (iii) chất bảo vệ gan, ví dụ, emericasan (IDN-6556), ME-3738, silibinin, và MitoQ;
- (iv) chất ức chế nucleosit hoặc nucleotit của HCV NS5B polymeaza, ví dụ, R1626, R7128 (R4048), IDX184, IDX-102, PSI-661, PSI-938, PSI-7851, PSI-7977, BCX-4678, valopicitabin (NM-283), MK-0608 và TMC649128;

- (v) chất ức chế không nucleosit của HCV NS5B polymeaza, ví dụ, filibuvir (PF-868554), ABT-333, ABT-072, BI-207127, VCH-759, VCH-916, JTK-652, MK-3281, VBY-708, VCH-222, A848837, ANA-598, GL60667, GL59728, A-63890, A-48773, A-48547, BC-2329, VCH-796 (nesbuvir), GSK625433, BILN-1941, và XTL-2125;
- (vi) chất ức chế HCV NS5A, ví dụ, ACH-2928, AZD-2836 (A-831), AZD-7295 (A-689), BMS-766, BMS-790052, BMS-824393, và PPI-461;
- (vii) chất chủ vận TLR-7, ví dụ, imiquimod, 852A, ANA-773, ANA-975, AZD-8848 (DSP-3025), PF-04878691, và SM-360320 và hợp chất 8;
- (viii) chất ức chế xyclophilin, ví dụ, DEBIO-025, SCY-635, và NIM811;
- (ix) chất ức chế HCV IRES, ví dụ, MCI-067;
- (x) chất cải thiện được động học, ví dụ roxythromyxin, BAS-100, SPI-452, PF-4194477, TMC-41629;
- (xi) chất ức chế xâm nhập của của HCV;
- (xii) chất ức chế lắp ráp HCV;
- (xiii) chất ức chế sự thành thực của HCV;
- (xiv) chất ức chế khả năng lây nhiễm HCV; và
- (xv) thuốc khác để điều trị HCV, ví dụ, thymosin alpha 1 (Zadaxin), nitazoxanit (Alinea, NTZ), BIVN-401 (virostat), PYN-17 (altirex), KPE02003002, actilon (CPG-10101), KRN-7000, civacir, GI-5005, XTL-6865, BIT225, PTX-111, ITX2865, TT-033i, ANA 971, NOV-205, tarvacin, EHC-18, VGX-410C, EMZ-702, AVI 4065, BMS-650032, BMS-791325, Bavituximab, MDX-1106 (ONO-4538), Oglufanid, FK-788, và VX-497 (merimepodib).

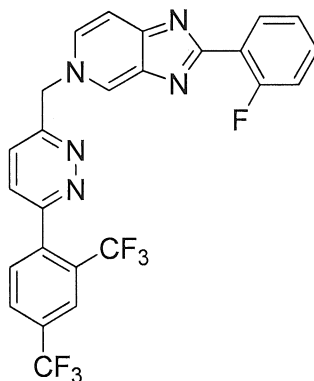
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ tổng hợp

Quy trình tổng hợp để điều chế các hợp chất 1, 2, 3, 6, 7 và 8 là đã biết trong các tài liệu thuộc lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, quy trình tổng hợp để điều chế mỗi hợp chất kết hợp được nêu trong các ví dụ dưới đây.

Hợp chất 1 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và các sản phẩm trung gian như được bộc lộ trong US 7,754,720. Hợp chất 1 cũng có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: 5-({6-[2,4-bis(triflometyl)phenyl]pyridazin-3-yl}metyl)-2-(2-flophenyl)-5H-imidazo[4,5-c]pyridin 1.



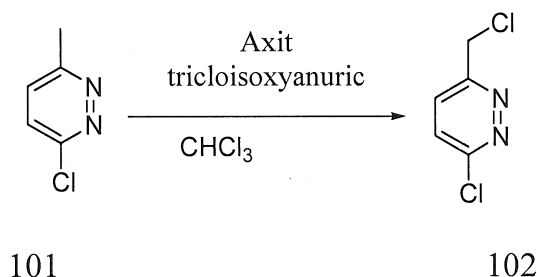
1

Hợp chất	MW	Lượng	Mol	Đương lượng
104	453,79	95 mg	0,209	1
DME	500 μ L			
Dung dịch nước Na_2CO_3 2N		313 μ L	0,626	3
105	257,93	80,9 mg	0,313	1,5
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	1155	12 mg	0,0104	0,05

Hợp chất 103 được hòa tan trong dimetoxietan (DME). Bổ sung vào dung dịch này axit 2,4-bis(triflometyl)phenylboronic 105 và dung dịch nước Na_2CO_3 2N. Bổ sung $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ vào hỗn hợp hai pha thu được và sau đó gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 72 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và lọc qua Xelit và rửa Xelit bằng EtOAc. Cô phần dịch lọc trong chân không. Tinh chế phần còn lại trên 6g SiO_2 bằng cách sử dụng MeOH/ CH_2Cl_2 để rửa giải hợp chất. Hợp chất thu được theo cách này bị nhiễm tạp chất $\text{PPh}_3(\text{O})$. Tinh chế lại sản phẩm trên đĩa Chromatotron 1 mm với 0 đến 5% MeOH/ CH_2Cl_2 với gia số 1% tăng dần trong các bước. Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và cô trong chân không, sau đó được làm khô trong chân không cao trong thời gian 12 giờ. Thu được 11,8 mg bazơ tự do của hợp chất 1 không có tạp chất PPh_3 . ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 6,20 (s, 2), 7,32 (m, 3), 7,52 (m, 1), 7,78 (d, 1), 7,89 (d, 1), 7,95 (s, 2), 8,15 (m, 3), 8,35 (d, 1), 9,12 (s, 1); LC/MS M+H = 518.

Hợp chất trung gian 104 được điều chế như sau.

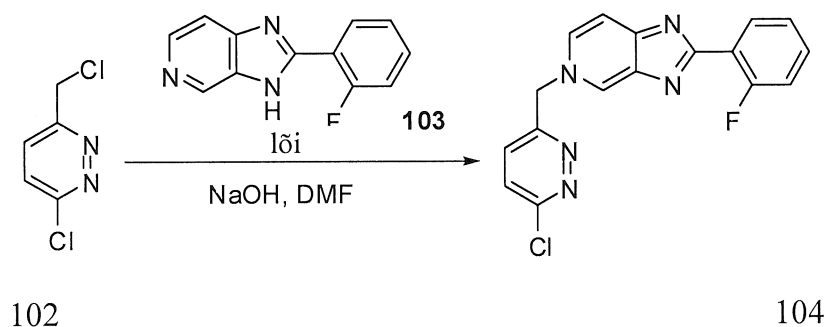
a. Điều chế hợp chất 102.



Hợp chất	MW	Lượng	mmol	Đương lượng
101	128,56	5 g	38,9	1
TCCA	232,41	3,62 g	15,6	0,4
CHCl ₃		130 mL		

Bổ sung axit tricloisoxyanuric (TCCA) vào dung dịch chứa nguyên liệu ban đầu có trên thị trường 101 trong CHCl₃ ở nhiệt độ 60°C. Sau đó, khuấy dung dịch này trong thời gian 1,5 giờ, làm nguội, và lọc bằng HiFlo-Xelit. Cô phần dịch lọc và làm khô trong chân không. Thu được 5,037 g hợp chất 102.

b. Điều chế hợp chất 104.



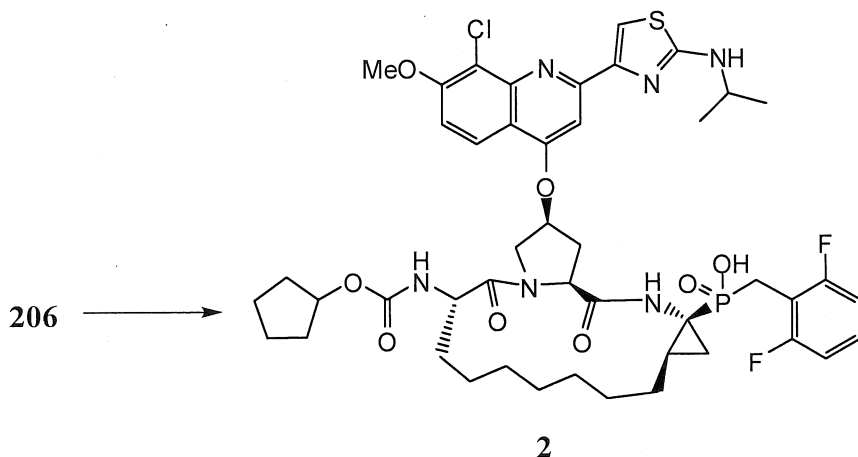
Hợp chất	MW	Lượng	mmol	Đương lượng
102	163	5,073 g	31,12	1
103	213,2	6,635 g	31,12	1
NaOH (10%)	40	1,245 g	31,12	1
DMF		320 mL		

Bổ sung NaOH vào dung dịch của hợp chất 103 trong DMF (dimetylformamit). Hòa tan hợp chất 102 trong DMF (20 mL) và bổ sung từ từ vào dung dịch. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 3 giờ, pha loãng bằng nước và chiết bằng EtOAc. Làm khô lớp hữu cơ bằng Na₂SO₄. Loại bỏ dung môi và sản phẩm được tái kết tinh với diclometan. Thu được 5,7 g hợp chất 103.

Hợp chất 2 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và các sản phẩm trung gian như được bộc lộ trong USSN 12/202319 (US

20100051763 A1). Hợp chất 2 cũng có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

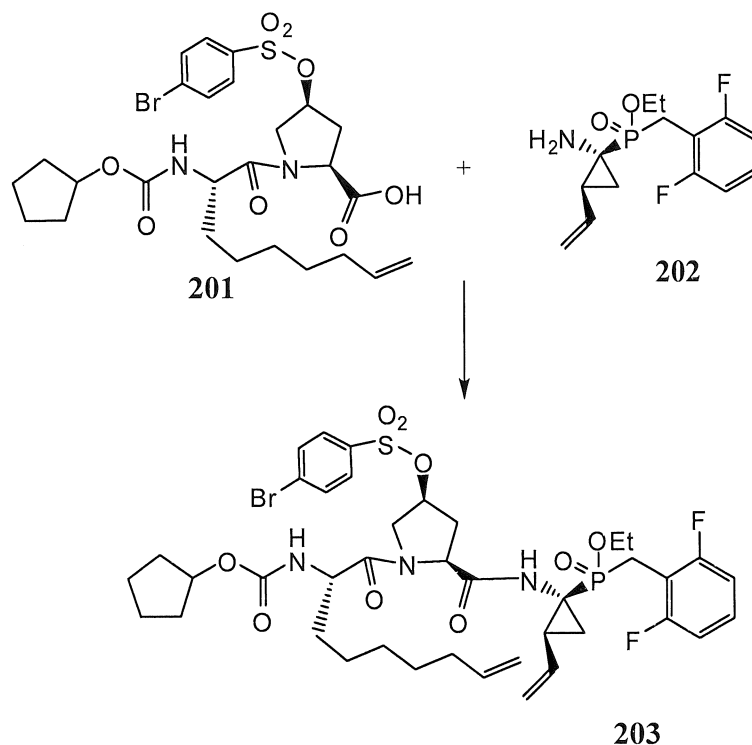
Ví dụ 2: Điều chế hợp chất 2.



Hòa tan este phosphinat 206 (23,7 g, 24,05 mmol) trong CH_3CN (240 mL) và làm lạnh xuống 0°C . Bổ sung nhỏ giọt theo nhịp nhanh iodotrimetylsilan (17,4 mL, 122,3 mmol), sau đó 10 phút bổ sung 2,6-lutidin (17,0 mL, 146,4 mmol). Làm ấm từ từ hỗn hợp phản ứng tới nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 1 giờ, sau đó làm lạnh trở lại xuống đến 0°C và bổ sung 2,6-lutidin (11,1 mL, 95,6 mmol), sau đó là MeOH (24 mL). Cô dung dịch trong chân không và tinh chế phần thô còn lại bằng HPLC để thu được 12,68 g hợp chất 2 với hiệu suất 55%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,35 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,64 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 7,35-7,22 (m, 1H), 7,02-6,89 (m, 2H), 5,85 (bs, 1H), 4,82-4,71 (m, 2H), 4,33 (bs, 1H), 4,28-3,99 (m, 3H), 4,16 (s, 3H), 3,57-3,28 (m, 2H), 2,90-2,78m, 1H), 2,63-2,50 (m, 1H), 2,08-1,91 (m, 1H), 1,91-1,70 (m, 2H), 1,70-1,13 (m, 22H), 1,37 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H); ^{31}P NMR (121,4 MHz, CD_3OD) δ 42,4; LCMS ($\text{M}+1$): 957,35. g.

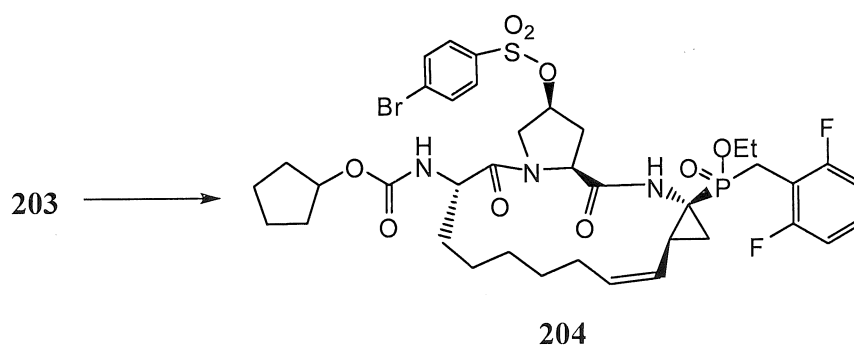
Hợp chất trung gian 206 được điều chế như sau.

a. Điều chế hợp chất 203.



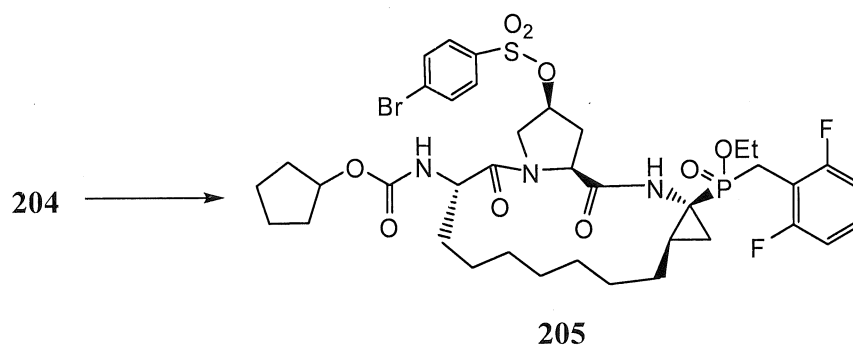
Hòa tan hợp chất 201 (17,42 g, 28,30 mmol) trong THF (136 mL) và làm lạnh xuống 0°C. Bổ sung N-metylmorpholin (4,7 mL, 42,7 mmol) vào dung dịch. Sau 10 phút ở nhiệt độ 0°C, bổ sung từng giọt *i*-butylchloroformat (4,05 mL, 30,96 mmol). Sau 1 giờ nữa, bổ sung từ từ etyl este của axit (1-amino-2-vinyl-xyclopropyl)-(2,6-diflo-benzyl)-phosphinic 202 (8,94 g, 29,70 mmol) dưới dạng dung dịch trong THF (20 mL). Làm ấm huyền phù lên nhiệt độ trong phòng, và sau 2 giờ, nó được phân bố giữa H₂O (400 mL) và etylaxetat (200 mL). Chiết lớp nước bằng etylaxetat (200 mL x 2) và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng HCl (1N, 225 mL) và H₂O (200 mL). Phần nước rửa bằng axit và phần nước rửa bằng nước được kết hợp và được chiết lại bằng etylaxetat (175 mL x 2, 100 mL x 2). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước muối (400 mL), làm khô qua Na₂SO₄, và cô trong chân không, tạo ra 25,06 g dien 203 với hiệu suất thô là 98,5%. LCMS (M + 1): 898,06.

b. Điều chế hợp chất 204.



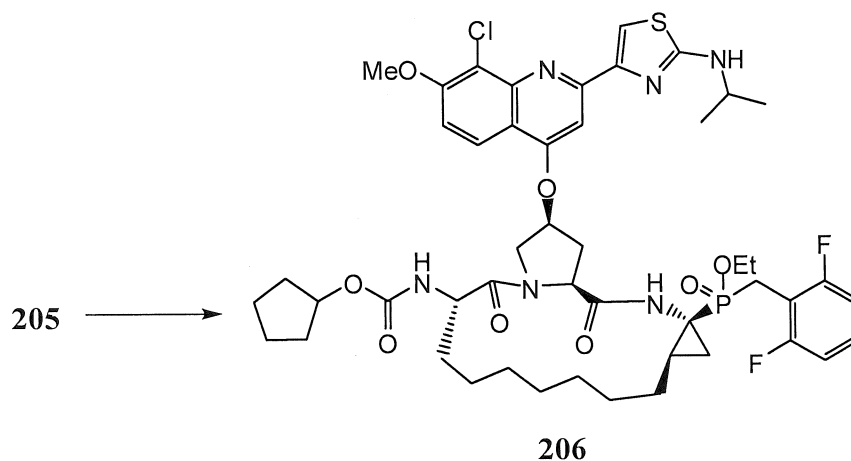
Hòa tan hợp chất 203 (12,91 g, 14,36 mmol) trong CH_2Cl_2 (1440 mL) và loại khí trong dung dịch trong 30 phút. Gia nhiệt dung dịch đến 40°C và bổ sung chất xúc tác G1 Grubb (2,95 g, 3,59 mmol). Cho hồi lưu hỗn hợp phản ứng trong thời gian 17 giờ, sau đó bổ sung tris-hydroxymetylphosphin (22,3 g, 18,0 mmol), TEA (50 mL, 35,9 mmol) và H_2O (400 mL), và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến hồi lưu trong 16 giờ nữa. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và hai lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng H_2O (400 mL) và nước muối (300 mL), làm khô qua MgSO_4 , và cô. Tinh chế phần thô còn lại bằng sắc ký trên silicagel để thu được 8,30 g olefin vòng lớn (macro) 204 với hiệu suất là 66%. LCMS ($M + 1$): 870,09.

c. Điều chế hợp chất 205.



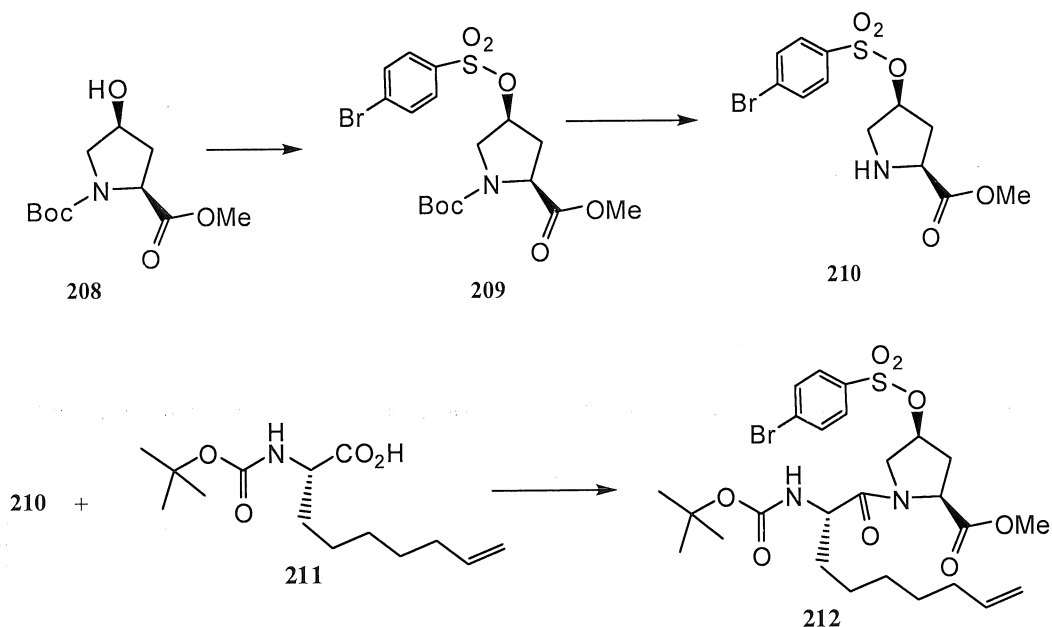
Hòa tan olefin vòng lớn 204 (7,34 g, 8,42 mmol) trong etylaxetat (105 mL) và bổ sung rodi trên nhôm oxit (5% khối lượng, 2,945 g, 0,40% khối lượng). Hút chân không hỗn hợp và sục H_2 (1 atm (100 kPa), 3x). Sau 3 giờ, bổ sung rodi trên nhôm oxit (5% khối lượng, 842 mg, 0,10% khối lượng) vào hỗn hợp, và hút chân không và sục H_2 (1 atm (100 kPa), 3x). Sau 1 giờ nữa, lọc huyền phù và cô trong chân không, tạo ra 6,49 g hợp chất vòng lớn được khử 205 với hiệu suất thô là 88%. LCMS ($M + 1$): 872,04.

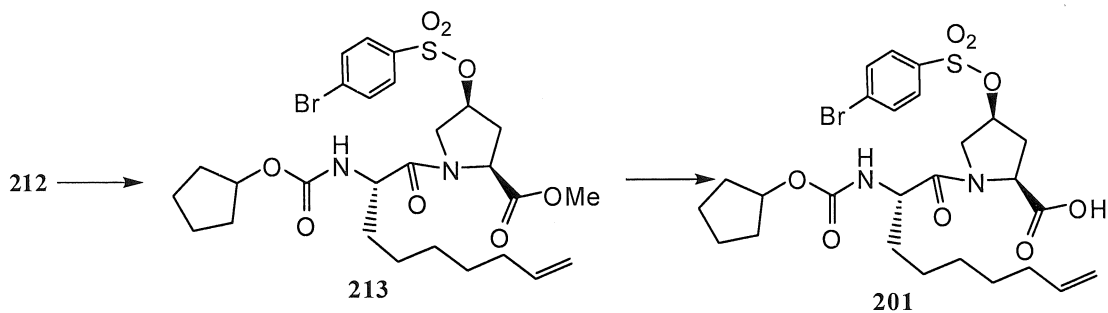
d. Điều chế hợp chất 206.



Hòa tan hợp chất vòng lớn brosylat 205 (6,49 g, 7,67 mmol) trong N-methylpyrrolidinon (25,0 mL) và 8-clo-2-(2-isopropylamino-thiazol-4-yl)-7-metoxiquinolin-4-ol 207 (2,564 g, 7,33 mmol), sau đó bổ sung Cs_2CO_3 (4,40 g, 13,50 mmol). Gia nhiệt hỗn hợp đến 65°C trong thời gian 6 giờ, sau đó pha loãng bằng etylaxetat (200 mL) và rửa bằng LiCl (5%, 250 mL). Chiết lớp nước bằng etylaxetat (100 mL x 2) và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước muối (150 mL), làm khô qua $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$, và cô trong chân không. Tinh chế phần thô còn lại bằng sắc ký trên silicagel (etylaxetat-metanol), thu được 4,39 g aminothiazol 206 với hiệu suất là 58%. LCMS (M + 1): 985,28.

Hợp chất trung gian 201 có thể được điều chế như sau.





e. Điều chế hợp chất 209.

Hòa tan hợp chất 208 (7,00 g, 28,55 mmol) và DABCO (5,13 g, 45,94 mmol) trong toluen (30 mL). Bổ sung dung dịch của brosylclorua (10,22 g, 40,01 mmol) trong toluen (11 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (210 mL) và bổ sung HCl 0,5N (200 mL). Hai lớp được tách riêng và lớp nước được chiết bằng EtOAc (2 x 200 mL). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước muối (200 mL), làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc, và cô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký CombiFlash để thu được 12,23 g hợp chất 209 với hiệu suất là 92%.

f. Điều chế hợp chất 210 và 212.

Xử lý hợp chất 209 (12,2 g, 26,3 mmol) bằng HCl 4N / 1,4-dioxan (60 mL) và khuấy trong thời gian 1 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng và làm khô trong chân không trong thời gian 20 phút. Hòa tan muối HCl amin thô của hợp chất 210 trong DMF (150 mL) và bổ sung axit 211 (14,2 g, 52,6 mmol). Bổ sung HATU (20,0 g, 52,6 mmol) và NMM (13,5 g, 131,5 mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (300 mL), rửa bằng HCl 1N (200 mL), NaHCO_3 bão hòa, nước muối, làm khô bằng Na_2SO_4 , và cô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký CombiFlash để thu được 15,1 g hợp chất 212 với hiệu suất là 93%.

g. Điều chế hợp chất 213.

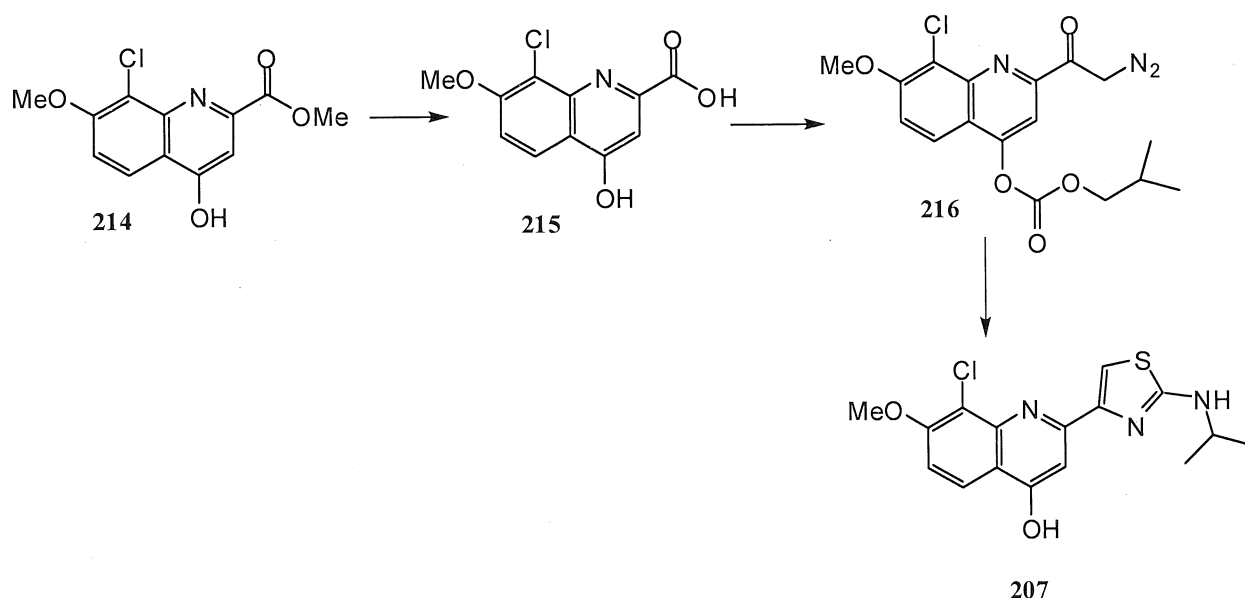
Bổ sung HCl 4N trong 1,4-dioxan (50 mL, 200 mmol) vào dung dịch của 212 (12,8 g, 20,7 mmol) trong CH_2Cl_2 (50 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ, cô, làm khô trong chân không trong thời gian 20 phút, và sau đó hòa tan trong CH_3CN (50 mL). Bổ sung dung dịch nước bão hòa NaHCO_3 (50 mL) và khuấy trong 5 phút. Bổ sung xyclopentylclorofomat mới được điều chế trong THF (50 mL). Phản ứng xảy ra hoàn toàn trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi dưới áp suất

giảm và pha loãng phần còn lại bằng EtOAc. Hỗn hợp được điều chỉnh đến độ pH = 2 bằng HCl 1N và hai lớp được tách riêng. Các lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô để thu được hợp chất thô 213 (3,18 g).

h. Điều chế hợp chất 201.

Este thô 213 (3,18 g, 5,07 mmol) được hòa tan trong THF (25 mL), H₂O (25 mL), và sau đó MeOH (6 mL) và LiOH (660 mg, 25,4 mmol) được bổ sung. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ và pha loãng bằng EtOAc. Hỗn hợp phản ứng được axit hóa tới độ pH là 2 bằng HCl 1N và hai lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, cô và làm khô trong chân không để thu được 3,09 g axit 201.

Hợp chất trung gian 8-clo-2-(2-isopropylamino-thiazol-4-yl)-7-metoxiquinolin-4-ol 207 có thể được điều chế như sau.



i. Điều chế axit 8-clo-4-hydroxy-7-metoxiquinolin-2-carboxylic 215.

Bổ sung dung dịch của LiOH (30,5 g, 0,725 mol) trong H₂O (80 mL) vào dung dịch của methyl 8-clo-4-hydroxy-7-metoxiquinolin-2-carboxylat 214 (36,5g, 0,145 mol) trong hỗn hợp 1:1 của MeOH: THF (tổng cộng là 160 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong thời gian một giờ khi phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hoá hoàn toàn thành axit carboxylic. Hỗn hợp phản ứng được xử lý bằng cách loại bỏ các chất dễ bay hơi và điều chỉnh độ pH của dung dịch thành 6 bằng cách sử dụng

dung dịch nước HCl 6N. Phần gôm còn lại thu được được lọc và làm khô trên máy làm đông khô trong thời gian 2 ngày để tạo ra 34,4 g (99,6%) hợp chất 215 dưới dạng chất rắn màu trắng. EI MS (m/z) 253,9 [M+H].

j. Điều chế 2-(2-diazo-1-oxo)-8-clo-7-metoxiquinolin-4-yl isobutyl cacbonat 216.

Bổ sung trietyl amin (12,3 mL, 0,088 mol) và *i*-butylclorofomat (11,6 mL, 0,088 mol) vào dung dịch của axit 8-clo-4-hydroxy-7-metoxiquinolin-2-carboxylic 215 (10,2 g, 0,04 mol) trong THF (400 mL) ở nhiệt độ 0°C trong môi trường argon. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1 giờ khi phân tích LCMS cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn để tạo ra anhydrit hỗn hợp mong muốn. EI MS (m/z) 454,0 [M+H]. Bổ sung dung dịch của diazometan 1M (121 mL, 0,121 mol) trong dietyl ete vào hỗn hợp phản ứng của anhydrit qua phễu nhựa ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp này được khuấy trong khi ấm lên đến nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ nữa. Phân tích hỗn hợp bằng LCMS cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn. Vách ngăn được tháo ra và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 20 phút nữa trước khi loại bỏ dung môi. Phần còn lại được tiếp tục làm khô trong chân không cao để tạo ra hợp chất 216, mà được sử dụng trong bước tiếp theo. EI MS (m/z) 377,9 [M+H].

k. Điều chế 8-clo-2-(2-(isopropylamino)thiazol-4-yl)-7-metoxiquinoiin-4-ol 207.

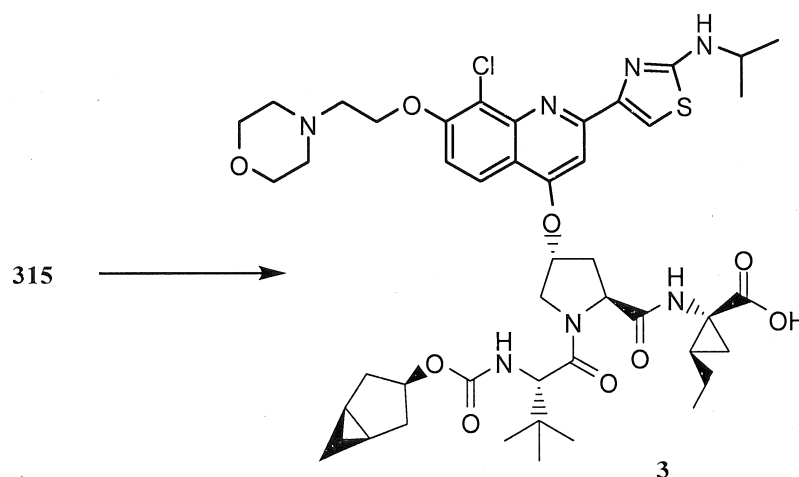
Bổ sung từ từ HBr 48% (23 mL, 0,201 mol) vào dung dịch đã nguội của 2-(2-diazo-1-oxo)-8-clo-7-metoxiquinolin-4-yl isobutyl cacbonat 216 (15,2 g, 0,040 mol) ở nhiệt độ 0°C trong THF (268mL) trong thời gian 15 phút. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 40 phút nữa khi phân tích LCMS cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng được xử lý bằng cách bổ sung dung dịch nước NaOH 1N (180 mL) ở nhiệt độ 0°C để điều chỉnh độ pH của lớp nước thành 9. Các lớp được tách và lớp nước được rửa bằng EtOAc (2 x 200 mL). Các phần chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối và làm khô qua MgSO₄. Loại bỏ dung môi trong chân không để tạo ra 17,7 g chất rắn màu vàng. EI MS (m/z) 431,9 [M+H].

Dung dịch của bromoketon thu được từ phản ứng trên đây được tạo huyền phù trong *i*-propanol (270 mL) và isopropylisoure (9,4 g, 0,080 mol). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 32 giờ. Phân tích LCMS của phản ứng cho thấy sự chuyển hoá hoàn toàn thành sản phẩm mong muốn. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng để cho phép sản phẩm kết tủa ra khỏi dung dịch. Hỗn

hợp phản ứng được tiếp tục làm lạnh xuống 0°C trong thời gian 12 giờ trước khi lọc. Phần dịch lọc được rửa bằng ete và làm khô trên máy làm đông khô để tạo ra 8,03 g hợp chất 207 dưới dạng chất rắn màu da cam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,21 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,44 (d, $J=10$ Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 4,05 (s, 3H), 3,92 (pentet, $J=6$ Hz, 1H), 1,25 (d, $J=7$ Hz, 6H): EI MS (m/z) 350,0 $[\text{M}+\text{H}]$.

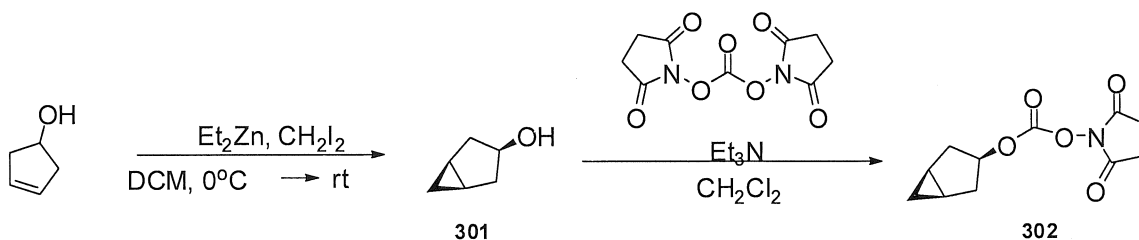
Hợp chất 3 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và các sản phẩm trung gian như được bộc lộ trong USSN 12/215,605 (US 20090257978 A1). Hợp chất 3 cũng có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 3: Điều chế hợp chất 3



Hòa tan hợp chất 315 (12 g, 13 mmol) trong THF (200 ml), bổ sung thêm LiOH (11g, 260 mmol) trong H_2O (200 mL), sau đó là MeOH (200 mL). Hỗn hợp được duy trì có khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ. Khi hoàn thành phản ứng, dung dịch nước HCl 4N được bổ sung để điều chỉnh độ pH thành 7 ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc (2 x 400 mL). Lóp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô (Na_2SO_4) và cô trong chân không để thu được hợp chất 3 dưới dạng chất rắn màu vàng (11 g, 93%). LC/MS = 911,52(M^++1). ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 7,95 (d, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,31 (d, 1H), 5,42 (s, 1H), 4,37 (dd, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,83-3,56 (m, 7H), 3,50 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,45 (m, 1H), 2,27(m, 1H), 1,62 (m, 2H), 1,50 (m, 1H), 1,33 (m, 2H), 1,18 (m, 1H), 1,05 (m, 8H), 0,90 (m, 3H), 0,76 (m, 11H), 0,14-0,04 (m, 2H)

Hợp chất trung gian 315 được điều chế như sau.

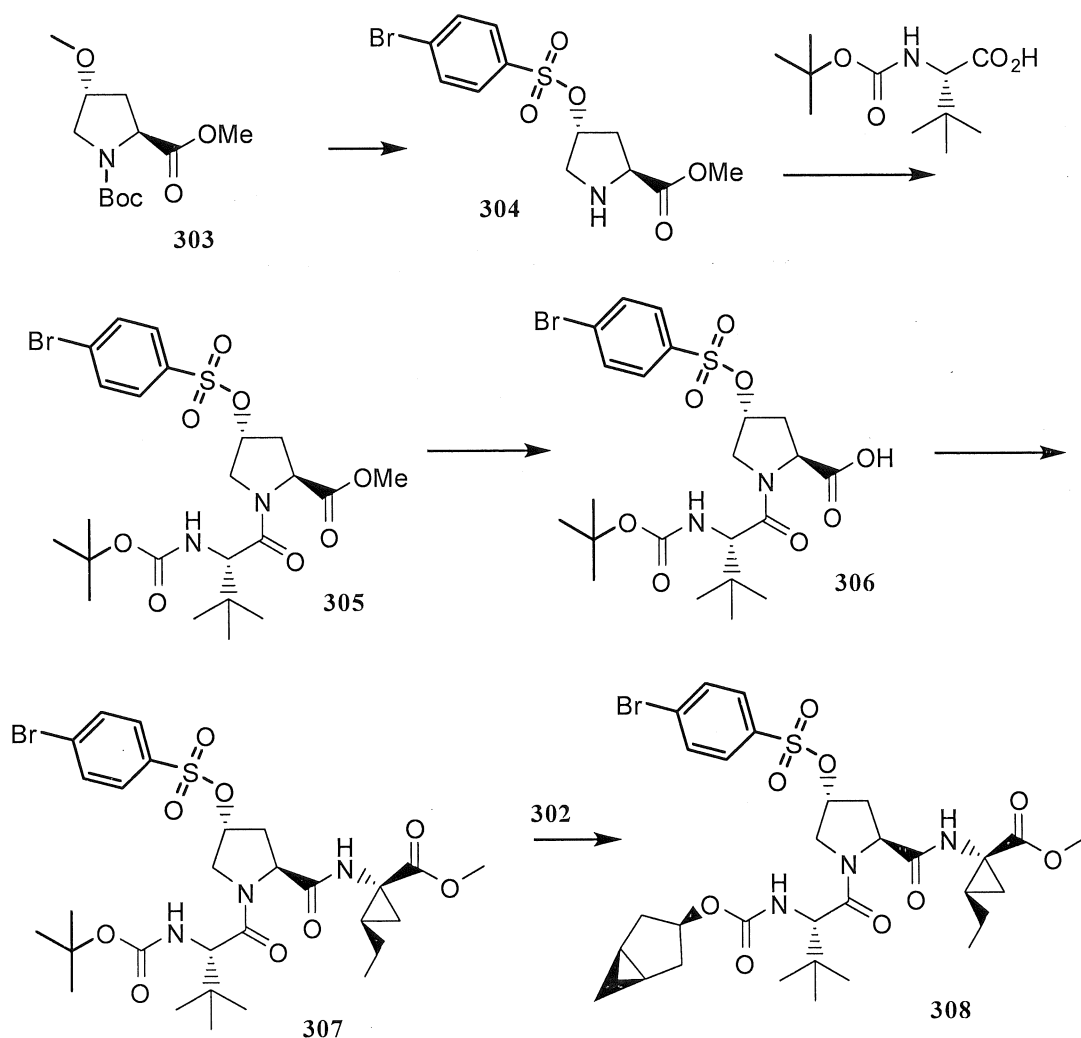


a. Điều chế hợp chất 301.

Bổ sung diclometan khan (100 mL) và Et_2Zn (28 mL, 273 mmol) vào bình đáy tròn ba cổ khô được sục khí argon (1000 mL) ở nhiệt độ 0°C (THẬN TRỌNG: Nguồn argon không thể từ kim. Chỉ sử dụng ống nối bằng thủy tinh thích hợp. Máy sục khí thứ hai cũng có thể được gắn vào bình để ngăn ngừa sự tăng áp suất quá mức). Sau đó, bổ sung từng giọt xyclopenten-3-ol (10,0 mL, 119 mmol) (lượng lớn khí etan được tạo thành) vào bình và khuấy hỗn hợp phản ứng cho đến khi sự thoát khí ngừng lại. Sau đó, bổ sung từng giọt diiodometan (22 mL, 242 mmol) trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được để ấm lên tới nhiệt độ trong phòng và tiếp tục khuấy qua đêm dưới dòng argon cưỡng bức, tại thời điểm đó phân tích TLC cho thấy sự tiêu thụ hoàn toàn của rượu ban đầu. Sau đó, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng CH_2Cl_2 và làm dừng phản ứng bằng HCl 2M (chất kết tủa màu trắng cần được hòa tan hoàn toàn). Hỗn hợp hai pha được rót vào phễu chiết và lớp hữu cơ được thu gom. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm cho đến khi còn lại 100 mL nguyên liệu chứa hợp chất 301.

b. Điều chế hợp chất 302.

Bổ sung diclometan khan (525 mL) vào bình, sau đó bổ sung từng giọt triethylamin (34 mL, 245 mmol). Tiếp tục khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng dưới dòng nitơ cưỡng bức, tại thời điểm đó, bổ sung từng phần disuxinimidylcacbonat (40,7 g, 159 mmol) vào bình. Khuấy hỗn hợp phản ứng cho đến khi phân tích TLC cho thấy sự tiêu thụ hoàn toàn của nguyên liệu ban đầu (2-3 ngày). Sau khi hoàn thành, làm dừng hỗn hợp phản ứng bằng HCl 1M (200 mL x 2) và rửa bằng H_2O (200 mL x 2). Chiết nguyên liệu mong muốn bằng cách sử dụng CH_2Cl_2 và các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng cách sử dụng MgSO_4 khan và được cho đi qua nút silic oxit. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và nguyên liệu thô được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký nhanh ($R_f = 0,33$, 1:1 Hex/EtOAc) để tạo ra hợp chất 302 (22 g, 75%): ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 5,24 (t, 1H), 3,82 (s, 4H), 2,24 (m, 2H), 2,03 (d, 2H), 1,38 (m, 2H), 0,48 (m, 1H), 0,40 (m, 1H).



c. Điều chế hợp chất 304.

Metyl este của N-*t*-Boc-cis-4-hydroxy-L-prolin 303 (100,0 g, 407,7 mmol) và DABCO (1,5 đương lượng, 68,6 g, 611,6 mmol) được hòa tan trong toluen khan (200 mL) trong bình đáy tròn ba cổ dung tích 2L có bộ phận khuấy cơ học và phễu bổ sung. Sau khi làm lạnh dung dịch đến 0°C dưới N₂, dung dịch của 4-bromo-benzensulfonyl clorua (1,3 đương lượng, 135,6 g, 530,0 mmol) trong 300 mL toluen được bổ sung qua phễu bổ sung trong thời gian 60 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng và làm ấm tới nhiệt độ trong phòng qua đêm (16 giờ). Hỗn hợp được rót từ từ vào 2 L dung dịch nước Na₂CO₃ 1M, và sản phẩm được chiết bằng EtOAc (2 L). Sau khi pha hữu cơ được rửa bằng HCl 0,5N (2 L), H₂O (1 L), và nước muối (1 L), nó được làm khô (MgSO₄), được cô để thu được 195,45 g sản phẩm brosylat dạng dầu màu vàng.

Bổ sung từ từ HCl 4,0M trong dioxan (500 mL, 5 đương lượng) vào dung dịch của brosylat trên đây (407,7 mmol) trong diclometan (300 mL) và khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Sau khi bổ sung ete (500 mL) vào

hỗn hợp phản ứng, khuấy hỗn hợp trong thời gian 15 phút và thu lấy chất kết tủa màu trắng bằng cách lọc. Chất rắn được rửa bằng ete và hexan và sau đó được làm khô trong chân không qua đêm để thu được 153,0 g muối amin HCl của hợp chất 304, 381,8 mmol, với hiệu suất là 94% cho hai bước.

d. Điều chế hợp chất 305.

Bổ sung HATU (217,76 g, 572,7 mmol) và bazơ Hunig (126 mL, 1145,4 mmol) vào dung dịch của Boc-*tert*-butyl-glyxin (97,0 g, 420,0 mmol) trong DMF (200 mL) và metylen clorua (200 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy hỗn hợp trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, bổ sung dung dịch của muối HCl trên đây (153,0 g, 381,8 mmol) và bazơ Hunig (126 mL, 1145,4 mmol) trong DMF (200 mL) và diclometan (200 mL) vào hỗn hợp axit trên đây trong một phần. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ, có theo dõi bằng LCMS. Cô hỗn hợp phản ứng để loại bỏ diclometan dưới áp suất giảm và chất rắn màu trắng tạo thành được lọc ra. Pha loãng dung dịch DMF còn lại bằng etyl axetat (1 L), rửa lần lượt bằng 3% LiCl (trong nước) (3x650 mL), NH₄Cl bão hoà (2x500 mL), HCl 0,5N (trong nước) (2x600 mL), nước muối (500 mL), NaHCO₃ bão hoà (3x500 mL), và nước muối (500 mL). Phân đoạn hữu cơ thu được được làm khô (MgSO₄) và cô để thu được hợp chất 305 (111g).

e. Điều chế hợp chất 306.

Bổ sung dung dịch của LiOH (26,18 g, 623,4 mmol) trong H₂O (150 mL) vào dung dịch của metyl este 305 (120 g, 207,8 mmol) trong THF (300 mL), MeOH (75 mL). Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp được làm nguội trong bể nước đá trong khi axit hoá bằng HCl 3N tới độ pH khoảng 5,5, khuấy trong thời gian 10 phút, và chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc. Chất rắn được rửa bằng nhiều nước, ete và hexan hơn. Chất rắn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 40°C qua đêm để thu được 95,78g (82%) của axit 306.

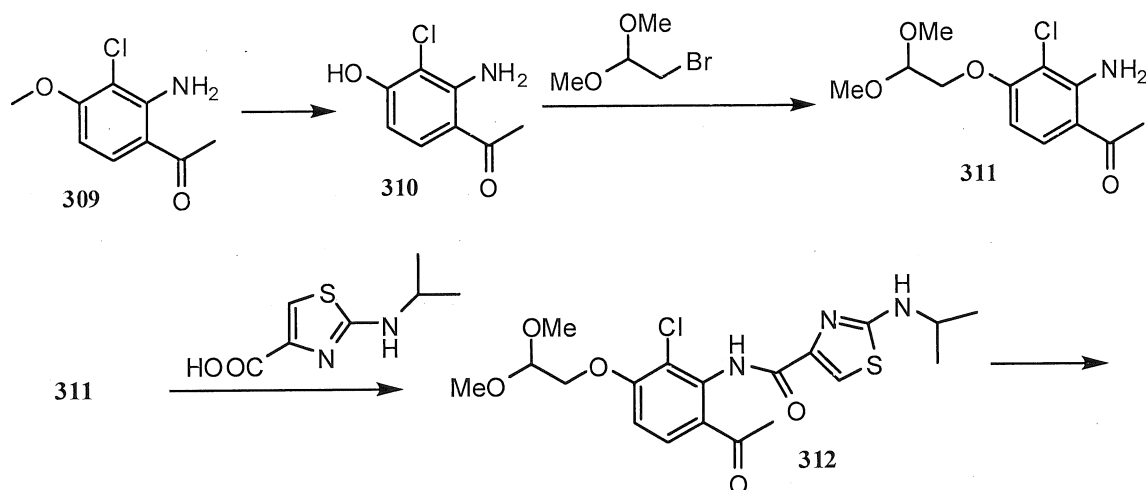
f. Điều chế hợp chất 307.

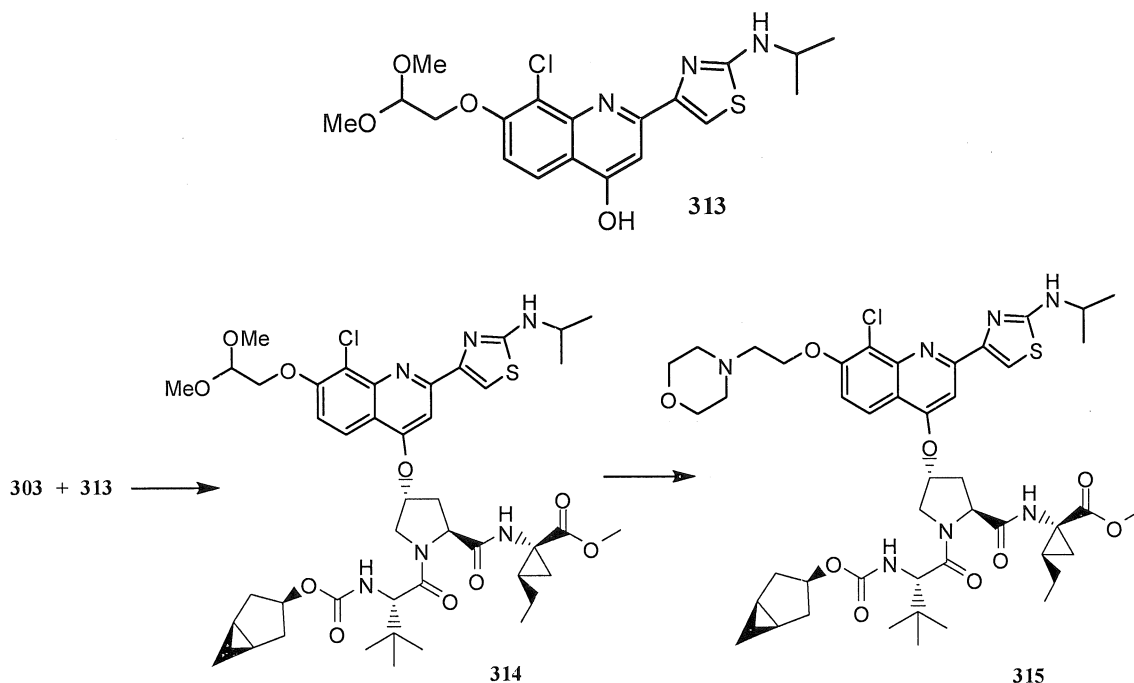
Bổ sung HATU (82,3g, 216,4 mmol) và bazơ Hunig (47,5 mL, 432,8 mmol) vào dung dịch của axit carboxylic 306 (81,4 g, 144,27 mmol) trong DMF (200 mL) và diclometan (200 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khuấy hỗn hợp trong thời gian

20 phút ở nhiệt độ trong phòng, dung dịch của amin (158,7 mmol) và bazơ Hunig (47,5 mL, 1145,4 mmol) trong DMF (200 mL) và diclometan (200 mL) được bổ sung vào hỗn hợp axit trên đây trong một phần. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ và theo dõi bằng LCMS. Sau khi hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm để loại bỏ diclometan, chất rắn màu trắng tạo thành được lọc ra. Pha loãng dung dịch DMF còn lại bằng etyl axetat (600 mL) và lần lượt rửa bằng 3% LiCl (trong nước) (2x550 mL), NH₄Cl bão hoà (500 mL), HCl 1N (trong nước) (500 mL), NaHCO₃ bão hoà (500 mL), và nước muối (300 mL). Phân đoạn hữu cơ thu được được làm khô (Na₂SO₄) và cô để thu được hợp chất 307 (111 g).

g. Điều chế hợp chất 308.

Hợp chất 307 được hòa tan trong HCl 4N trong dioxan (300 mL) ở nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau đó, hỗn hợp này được cô trong chân không, và được làm bay hơi đồng thời với diclometan (2 x 200 mL) tới khô. Phần còn lại được hòa tan trong EtOAc (600 mL) và NaHCO₃ bão hoà trong nước (1 L). Hỗn hợp thu được được khuấy mạnh. Sau 10 phút, 2,5-dioxo-pyrolidin-1-yl este bixyclo[3,1,0]hex-3-yl este của axit cacbonic 302 (41,4 g, 173,1 mmol) được bổ sung trong một phần. Sau khi hỗn hợp thu được được khuấy trong 30 phút nữa, lớp hữu cơ được thu gom và rửa bằng nước muối (500 mL), làm khô (Na₂SO₄), và cô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký nhanh trên silicagel với etyl axetat/hexan để thu được 94,44 g (92%) hợp chất 308.





h. Điều chế hợp chất 310.

1-(2-amino-3-clo-4-hydroxy-phenyl)-etanon 309 (70,7 g, 354 mmol) được khuấy trong dung dịch nước HBr 48% (500 mL) ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 72 giờ. Sau khi hỗn hợp được làm lạnh xuống 0°C có khuấy, chất rắn được lọc và rửa bằng nước. Chất rắn thu được được nghiền nhỏ bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa (khoảng 350 mL), lọc, rửa bằng nước, và làm khô trong chân không để thu được khoảng 40 g (61%) hợp chất thô 310 dưới dạng chất rắn màu nâu đậm. LC/MS = 186 (M⁺+1).

i. Điều chế hợp chất 311.

1-(2-amino-3-clo-4-hydroxy-phenyl)-etanon 310 (40 g, 215 mmol) được hòa tan trong DMF (360 mL). Xesi cacbonat (140 g, 430 mmol) được bổ sung, sau đó là bromoaxetaldehyt dimetyl axetal (54,5 g, 323 mmol). Sau đó, hỗn hợp được khuấy mạnh ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 24 giờ. Sau khi làm nguội tới nhiệt độ trong phòng, EtOAc (1 L) và H₂O (1 L) được bổ sung vào hỗn hợp. Lớp hữu cơ được chiết bằng EtOAc (1 x 400 mL). Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước LiCl 3% (2 x 1 L), nước muối, làm khô (Na₂SO₄) và cô trong chân không. Tinh chế phân còn lại bằng sắc ký trên silicagel để thu được hợp chất 311 dưới dạng chất rắn màu trắng (39 g, 67%).

j. Điều chế hợp chất 312.

Bổ sung từ từ phospho oxyclo-rua (9,47 g, 61,8 mmol) vào hỗn hợp của 1-[2-amino-3-clo-4-(2,2-dimetoxy-etoxy)-phenyl]-etanon 311 (13 g, 47,5 mmol) và axit isopropylaminothiazol-4-carboxylic hydrobromua (12,64 g, 47,5 mmol) trong pyridin (150 mL) ở nhiệt độ -40°C . Sau đó, hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 4 giờ. Khi hoàn thành phản ứng, H_2O (30 mL) được bổ sung từng giọt vào hỗn hợp. Sau đó, hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 15 phút nữa. Hỗn hợp được cô trong chân không. Pha loãng phần còn lại bằng EtOAc, rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa. Làm khô lớp hữu cơ (Na_2SO_4) và cô trong chân không. Phần còn lại được hòa tan trong CH_2Cl_2 , hexan được bổ sung từ từ vào dung dịch, và chất rắn màu vàng bắt đầu vỡ vụn. Tiếp tục bổ sung thêm hexan cho đến khi không còn sản phẩm trong nước cái để tạo ra hợp chất 312 (18 g, 85%).

k. Điều chế hợp chất 313.

[6-axetyl-2-clo-3-(2,2-dimetoxy-etoxy)-phenyl]-amit của axit 2-isopropylamino-thiazol-4-carboxylic 312 (18 g, 40,7 mmol) được tạo huyền phù trong toluen (400 mL). NaH (2,4 g, 61 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp được khuấy mạnh trong khi theo dõi sự thoát khí H_2 . Hỗn hợp chuyển thành dung dịch trong suốt trong quá trình gia nhiệt đến hồi lưu. Phản ứng diễn ra hoàn toàn sau khi hồi lưu trong thời gian 3 giờ. Hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Dung dịch của AcOH (69,2 mmol) trong H_2O (3 thể tích) được bổ sung vào hỗn hợp. Sau khi khuấy mạnh trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 0°C , chất rắn được thu gom bằng cách lọc, rửa lại bằng H_2O . Bã lọc ướt được làm khô trong chân không cao đến khối lượng không đổi để tạo ra hợp chất 313 (15 g, 86%).

l. Điều chế hợp chất 314.

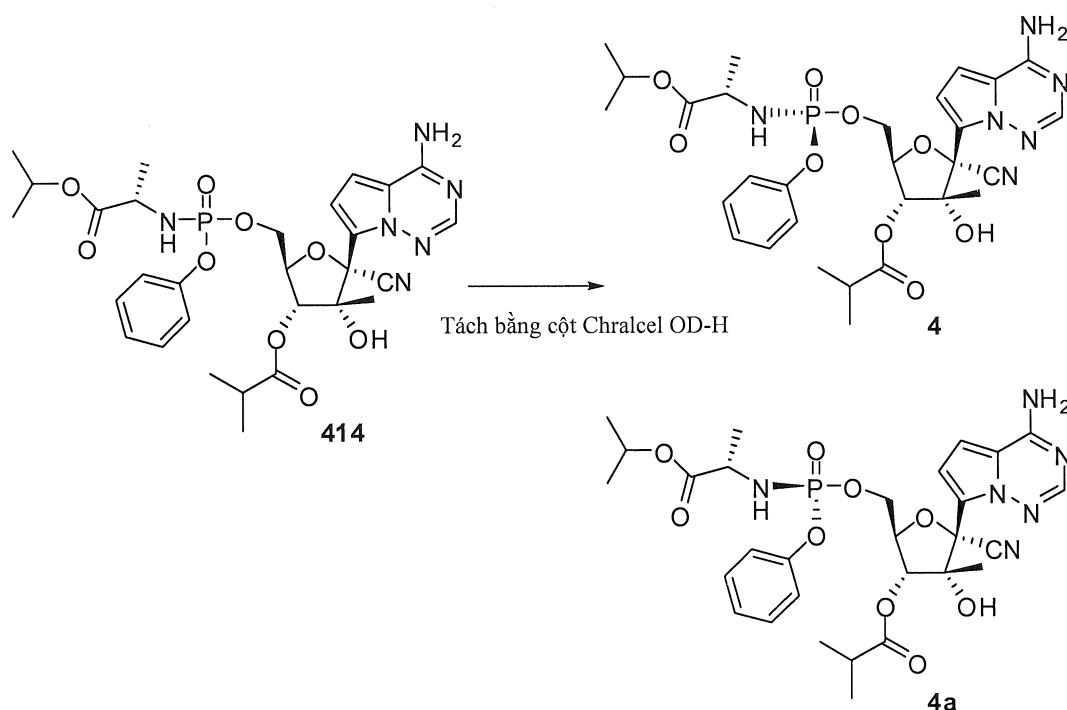
Bổ sung xesi cacbonat (25,1 g, 77 mmol) vào hỗn hợp của hợp chất trung gian brosylat 303 (15 g, 35 mmol) và hợp chất 313 (27,5 g, 38,5 mmol) trong NMP (200 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 5 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và EtOAc (600 mL) và dung dịch nước LiCl 3% (600 mL) được bổ sung vào hỗn hợp. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch nước LiCl 3% (1 x 600 mL), nước muối, làm khô (Na_2SO_4) và cô trong chân không. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký trên silicagel để thu được metyl este mong muốn dưới dạng chất rắn màu vàng (23,6 g, 75%). $\text{LC/MS} = 900,13(\text{M}^++1)$.

m. Điều chế hợp chất 315.

Metyl este 314 (23,6 g, 26 mmol) được hòa tan trong axit axetic băng (200 mL), dung dịch nước HCl 1,4N (75 mL) được bổ sung vào dung dịch. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ. Khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp được cô để loại bỏ dung môi, được làm bay hơi đồng thời với toluen (x 2) để loại bỏ axit axetic dư. Sau đó, phần còn lại được hòa tan trong EtOAc (500 mL) và dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (đủ để làm trung hòa hỗn hợp) trong khi theo dõi sự thoát khí CO₂. Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối, làm khô (Na₂SO₄) và cô trong chân không. Phần còn lại được tiếp tục làm khô trong chân không cao trong 1 giờ và được dùng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Chất thô được hòa tan trong CH₂Cl₂ (360 mL), morpholin (3,4 g, 39 mmol) và natri triaxetoxymorhydrit (7,2 g, 34 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp ở nhiệt độ 0°C. Sau đó, bổ sung từng giọt axit axetic băng (0,47 g, 7,8 mmol) vào hỗn hợp. Phản ứng diễn ra hoàn toàn trong 10 phút ở nhiệt độ 0°C. Dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa được bổ sung để làm ngừng phản ứng. Sau khi khuấy trong 20 phút nữa, rửa lớp hữu cơ bằng nước muối, làm khô (Na₂SO₄) và cô trong chân không. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký trên silicagel để thu được sản phẩm amin mong muốn 315 dưới dạng chất rắn màu vàng (12 g, 50%). LC/MS = 924,63(M⁺+1).

Hợp chất 4 có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 4: Điều chế hợp chất 4.



Hỗn hợp chất đồng phân không đối quang 414 được hòa tan trong heptan và isopropanol (70%:30%, 230 mg trong 4,5 mL dung môi hỗn hợp) và được tách bằng cột không đối xứng dưới các điều kiện sau đây:

Cột: Chiralcel OD-H, 2 x 25 cm

Hệ dung môi: 70% heptan và 30% isopropanol

Tốc độ chảy: 6 mL/phút.

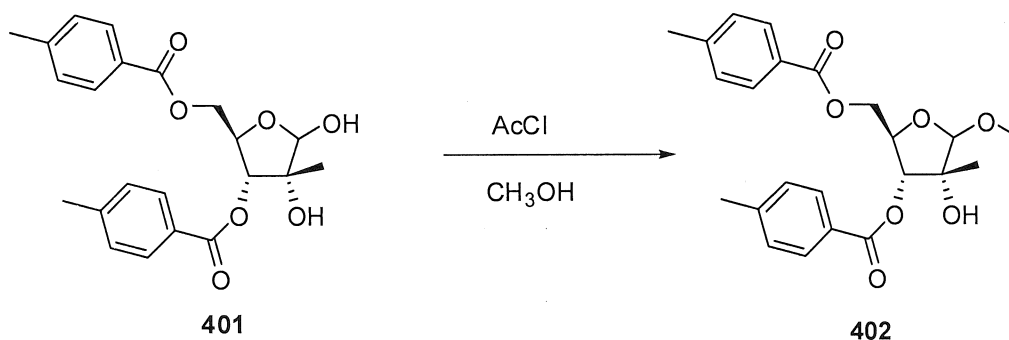
Thể tích tải trong mỗi lần chạy: 2,5 mL

Hợp chất 4 có thời gian lưu là 20 phút. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8,00 (s, 1H), 7,1-7,3 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,71 (d, 1H), 6,09 (brs, 2H), 5,95 (s, 1H), 5,04 (m, 2H), 4,67 (q, 1H), 4,35-4,52 (m, 2H), 4,00 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,40 (d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,98 (s, 3H). ^{31}P NMR (121,4 MHz, CDCl_3): δ 2,72 (s). Sau đó, hợp chất 4 được tái kết tinh từ MTBE để thu được các tinh thể đạt chuẩn tia X.

Hợp chất 4a có thời gian lưu là 50 phút. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,98 (s, 1H), 7,1-7,3 (m, 5H), 6,83 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 6,02 (brs, 2H), 5,95 (s, 1H), 5,08 (d, 1H), 5,00 (m, 1H), 4,68 (q, 1H), 4,38-4,56 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,40 (d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,99 (s, 3H). ^{31}P NMR (121,4 MHz, CDCl_3): δ 2,61 (s).

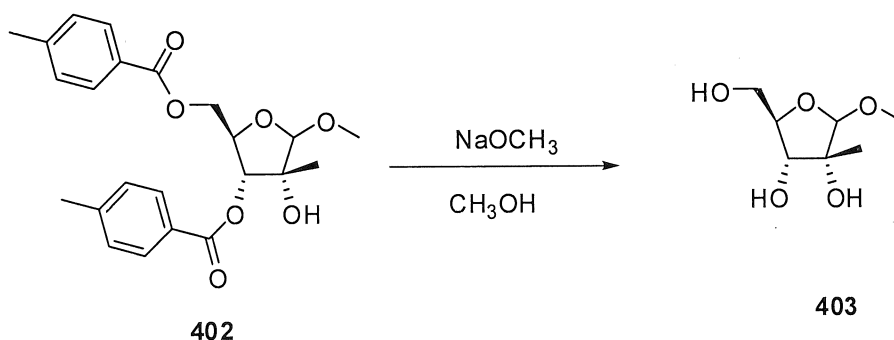
Hỗn hợp chất đồng phân không đối quang trung gian 414 được điều chế như sau.

a. Điều chế hợp chất 402.



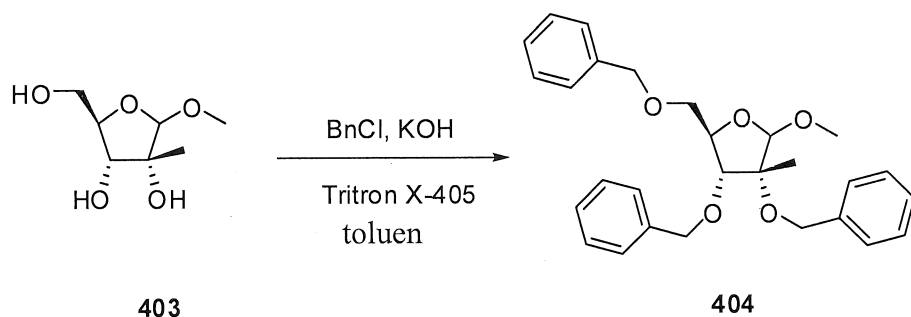
Bổ sung từng giọt axetyl clorua (22 mL) vào dung dịch của hợp chất 401 (22,0 g, 54,9 mmol, được điều chế theo các phương pháp được bộc lộ trong *J.O.C.*, 2004, 6257) trong metanol (300 mL) ở nhiệt độ 0°C bằng cách sử dụng phễu nhỏ giọt trong thời gian 30 phút và sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp được cô, được tái hòa tan trong etyl axetat (400 mL), rửa bằng NaOH 2N trong nước đá lạnh, và cô tới khô, thu được metyl ete thô 402 dưới dạng dầu. MS = 437,2 (M + Na⁺).

b. Điều chế hợp chất 403.



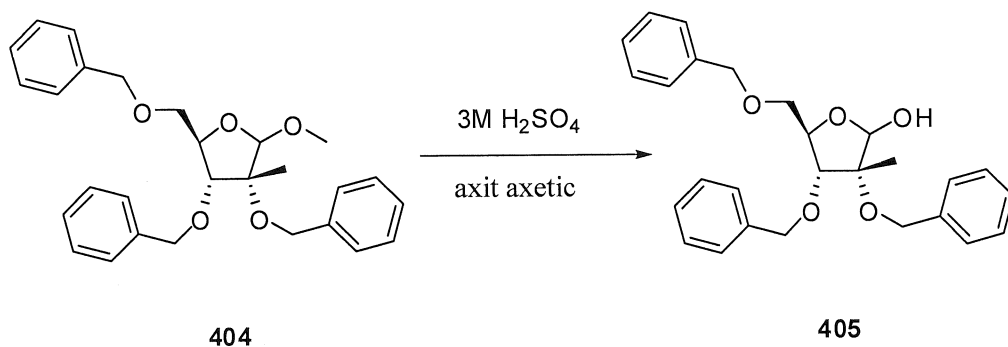
Bổ sung dung dịch natri metoxit 0,5M trong metanol (20 mL, 10 mmol) vào dung dịch của hợp chất 402 trong metanol (300 mL), và khuấy trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Làm dừng phản ứng bằng dung dịch HCl 4,0N trong dioxan (2,5 mL, 10 mmol). Sau đó, hỗn hợp được cô, thu được hợp chất thô 403. MS = 201,0 (M + Na⁺).

c. Điều chế hợp chất 404.



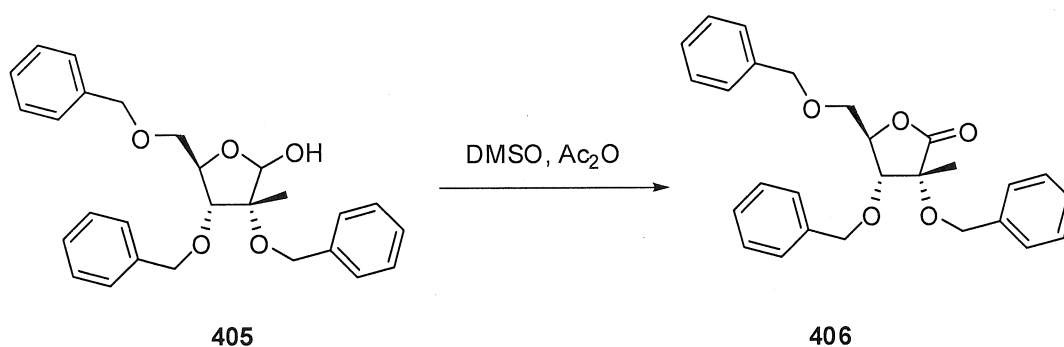
Hỗn hợp của hợp chất 403, Tritron X-405 (70% trong nước, 6,0 g), 50% KOH (trong nước, 85 g) trong toluen (500 mL) được gia nhiệt đến hồi lưu bằng ống chữ U Dean-Stark được gắn vào. Sau 1 giờ thu gom 25 mL nước, benzyl clorua (33 g, 260 mmol) được bổ sung và tiếp tục hồi lưu có khuấy trong thời gian 16 giờ. Sau đó, hỗn hợp được làm nguội và được phân bố giữa etyl axetat (400 mL) và nước (300 mL). Rửa lớp hữu cơ bằng nước (300 mL), và cô. Tinh chế phần còn lại bằng cột sắc ký silicagel (20% EtOAc / hexan), thu được metyl ete 404 dưới dạng dầu (22,0 g, 89% trong ba bước). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,3 (m, 15H), 4,5 - 4,9 (m, 7H), 4,37 (m, 1H), 3,87 (d, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,52 (s, 3H), 1,40 (s, 3H).

d. Điều chế hợp chất 405.



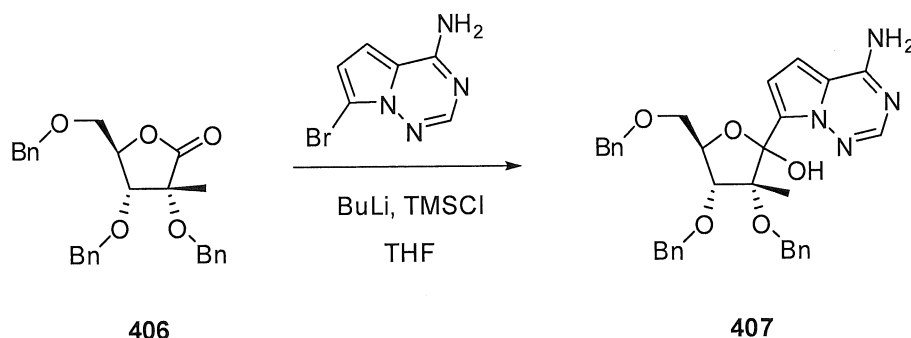
Bổ sung axit sulfuric 3M (được điều chế bằng cách trộn 4,8 g axit sulfuric đặc với 24 mL nước) vào dung dịch của 404 (22,0 g, 49,0 mmol) trong axit axetic (110 mL) và khuấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 8 giờ. Hỗn hợp được cô đến thể tích 20 mL, và được phân bố giữa etyl axetat và NaOH 2N trong nước đá lạnh. Lớp etyl axetat được cô, và được tinh chế bằng cột sắc ký silicagel (khoảng 35% EtOAc / hexan), thu được hợp chất 405 dưới dạng dầu (17,0 g, 80%). MS = 457,2 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

e. Điều chế hợp chất 406.



Bổ sung từng giọt anhydrit axetic (90 mL, 815 mmol) vào dung dịch của hợp chất 405 (45 g, 104 mmol) trong DMSO (135 mL) ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Khuấy hỗn hợp trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó rót vào nước đá-nước (1 L) trong khi khuấy. Sau khi nước đá tan hoàn toàn (30 phút), bổ sung etyl axetat (500 mL). Lớp hữu cơ được tách ra. Quy trình chiết này được lặp lại ba lần (3x500 mL). Các phần chiết hữu cơ được kết hợp và cô. Tinh chế phần còn lại bằng cột sắc ký silicagel (20% EtOAc / hexan), thu được hợp chất 406 dưới dạng dầu (39 g, 88%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7,3 (m, 15H), 4,4 - 4,8 (m, 7H), 4,08 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 3,75 (dd, $J = 2,4, 11,4$ Hz, 1H), 3,64 (dd, $J = 5,4, 11,4$ Hz, 1H), 1,51 (s, 3H).

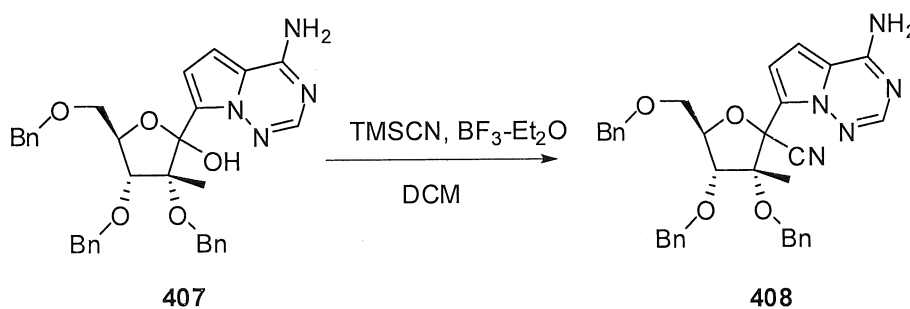
f. Điều chế hợp chất 407.



Bổ sung 7-bromo-pyrido[2,1-f][1,2,4]triazin-4-ylamin (234 mg, 1,10 mmol) (được điều chế theo WO2007056170) và THF khan (1,5 mL) vào bình đáy tròn khô được sục khí argon (100 mL). Sau đó, bổ sung TMSCl (276 μL , 2,2 mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong thời gian 2 giờ. Bình được đặt vào bể nước đá khô/axeton (-78°C) và bổ sung từng giọt BuLi (2,5 mL, 4,0 mmol, 1,6M trong hexan). Sau 1 giờ, dung dịch của hợp chất 406 (432,5 mg, 1,0 mmol) trong THF được làm lạnh xuống 0°C và sau đó bổ sung từng giọt vào bình phản ứng. Sau 1 giờ khuấy ở nhiệt độ -78°C , bình được làm ấm lên 0°C và NH_4Cl bão hòa (5 mL) được bổ sung để làm ngừng phản

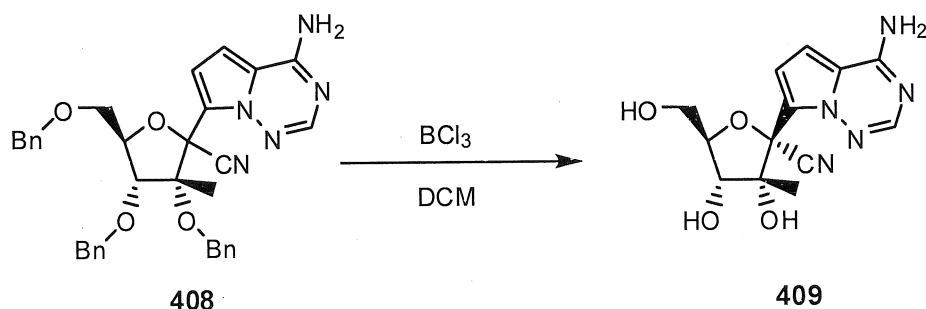
ứng. Các chất hữu cơ được chiết bằng cách sử dụng EtOAc (3 x 10 mL) và các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng cách sử dụng MgSO_4 . Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và nguyên liệu thô được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký nhanh (hexan / EtOAc). 560 mg (90%) hợp chất 407 được tách dưới dạng hỗn hợp của hai anome. LC/MS = 567,2 ($\text{M} + \text{H}^+$). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7,85 (m, 1H), 7,27 (m, 15H), 7,01 (m, 1H), 6,51 (m, 1H), 4,66 (m, 8H), 4,40 (m, 2H), 3,79 (m, 3H), 1,62 (s, 2'- CH_3 từ một anome), 1,18 (s, 2'- CH_3 từ anome còn lại).

g. Điều chế hợp chất 408.



Bổ sung TMSCN (1,4 mL, 10,5 mmol) và $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1 mL, 8,1 mmol) vào dung dịch của hợp chất 407 (1 g, 1,77 mmol) trong CH_2Cl_2 (20 mL) ở nhiệt độ 0°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 0,5 giờ, sau đó ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 0,5 giờ nữa. Làm dừng hỗn hợp phản ứng bằng NaHCO_3 ở nhiệt độ 0°C , và pha loãng bằng $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$. Pha hữu cơ được tách ra, rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$ -hexan (1:1 đến 2:1), để thu được hợp chất 408 (620 mg, 61%) dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân. MS = 576,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

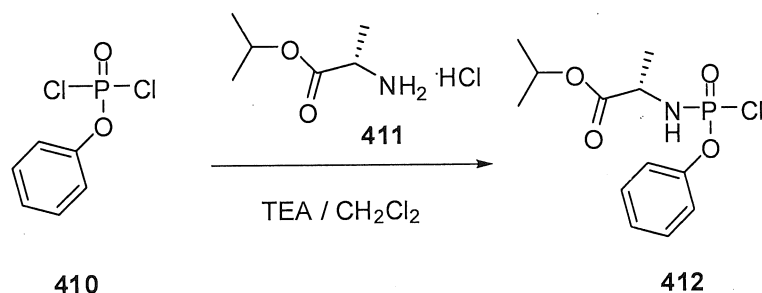
h. Điều chế hợp chất 409.



Bổ sung BCl_3 (2 mL, 1M trong CH_2Cl_2) vào dung dịch của hợp chất 408 (150 mg, 0,26 mmol) trong CH_2Cl_2 (4 mL) ở nhiệt độ -78°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 1 giờ. Làm dừng phản ứng ở nhiệt độ -78°C bằng cách

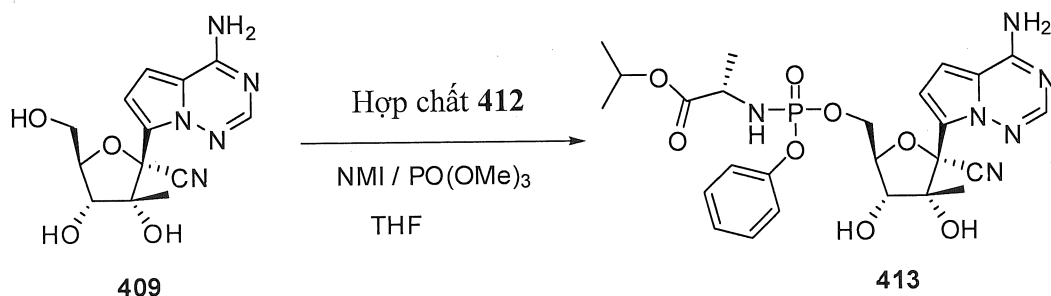
bổ sung từng giọt TEA (2 mL) và MeOH (5 mL). Hỗn hợp được làm ấm tới nhiệt độ trong phòng, được làm bay hơi, và được làm bay hơi đồng thời với MeOH một vài lần. Phần còn lại được xử lý bằng NaHCO_3 (1 g trong 10 mL H_2O), được cô và được tinh chế bằng HPLC để tạo ra sản phẩm hợp chất mong muốn 409 (48 mg, 60%). ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 7,74 (s 1H), 6,76 (d, $J = 5$ Hz, 1H), 6,73 (d, $J = 5$ Hz, 1H), 4,1 (m, 1H), 3,9 (m, 1H), 3,8 (m, 2H), 0,84 (s, 3H). MS = 305,9 ($\text{M} + \text{H}^+$). Ngoài ra, cũng thu được alpha-anome khác (9 mg, 11%): ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 7,70 (s 1H), 6,8 (d, $J = 5$ Hz, 1H), 6,7 (d, $J = 5$ Hz, 1H), 4,25 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,7 (m, 1H), 1,6 (s, 3H). MS = 306,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

i. Điều chế hợp chất 412.



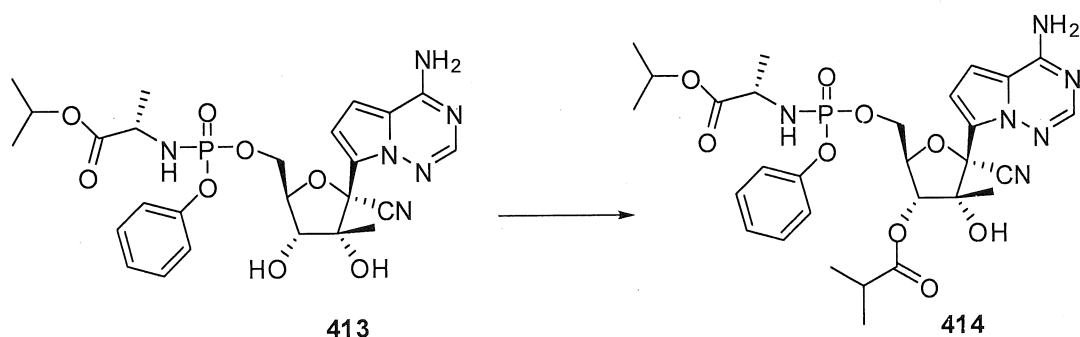
Hợp chất 410 (có trên thị trường, 4,99 g, 23,8 mmol) được hòa tan trong diclometan (100 mL) và alanin isopropyl este hydroclorua 411 (3,98 g, 23,8 mmol) được bổ sung. Dung dịch thu được được làm lạnh ở -78°C trong 30 phút. Bổ sung từng giọt triethylamin (6,63 mL, 47,5 mmol) trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp sau đó được để ấm lên tới nhiệt độ trong phòng. Sau 16 giờ, loại bỏ dung môi bằng dòng argon. Phần còn lại được tái hòa tan trong MTBE (25 mL) và phần không tan được loại bỏ bằng cách lọc trong môi trường argon. Phần dịch lọc được ngưng tụ bằng dòng argon và sản phẩm thô 412 được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7,1-7,4 (m, 5H), 5,1 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 1,5 (d, 3H), 1,2 (m, 6H). ^{31}P NMR (121,4 MHz, CDCl_3): δ 7,8 và 8,4 (2s).

j. Điều chế hợp chất 413.



Bổ sung *N*-metyl imidazol (1,5 g, 18,3 mmol) vào dung dịch của hợp chất 409 (1,03 g, 3,37 mmol) trong trimetyl phosphat (2,0 mL) và THF (20 mL) ở nhiệt độ 0°C. Dung dịch của hợp chất 412 (2,5 g, 8,18 mmol) trong THF (3 mL) được bổ sung từng giọt. Hỗn hợp thu được được để ấm lên tới nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1,5 giờ. Hỗn hợp này được phân bố giữa etyl axetat và nước. Lớp etyl axetat được cô và phần còn lại được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (etyl axetat đến 10% etanol / etyl axetat), thu được 1,15 g (59%) hợp chất 413 dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang 1:1 tại nguyên tử phospho. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8,02 (s, 1H), 7,1-7,4 (m, 5H), 6,8 (2d, 1H), 6,7 (2d, 1H), 6,08 (brs, 2H), 5,03 (m, 1H), 4,6 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 3,9-4,1 (m, 3H), 1,31 (d, 3H), 1,2 (m, 6H), 0,83 (s, 3H). ^{31}P NMR (121,4 MHz, CDCl_3): δ 2,78 (s). MS = 575,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

k. Điều chế hợp chất 414.

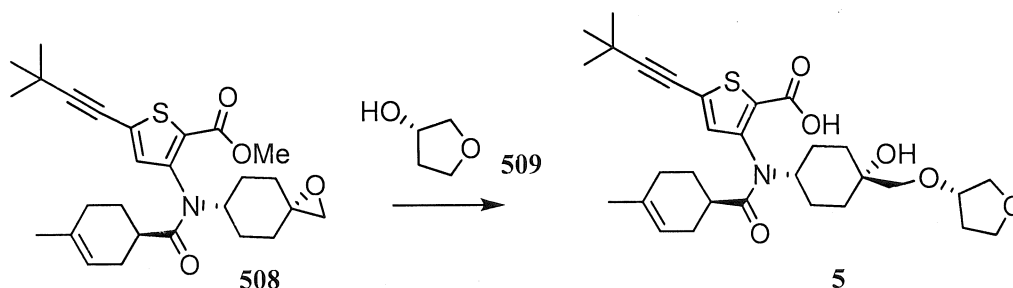


Bổ sung *N,N*-dimetylformamit dimetyl axetal (41 μL , 0,34 mmol, 1,1 đương lượng) vào dung dịch của hợp chất 413 (175 mg, 0,305 mmol) trong axetonitril (2 mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Phản ứng diễn ra hoàn toàn (bằng LCMS). Sau đó, hỗn hợp được cô tới khô. Bổ sung DCC (250 mg, 1,21 mmol, 4 đương lượng), axetonitril (5 mL) và axit isobutyric (55 mg, 58 μL , 2 đương lượng) vào phần còn lại. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 48 giờ. Nước (0,2 mL) và axit trifloaxetic (0,1 mL) được bổ sung ở nhiệt độ 0°C và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 64 giờ. Natri bicacbonat (500 mg) được bổ sung ở nhiệt độ 0°C. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 0,5 giờ và lọc. Cô phần dịch lọc và tinh chế phần còn lại bằng cột sắc ký silicagel (5% metanol / diclometan), thu được 144 mg (73%) hợp chất 414 dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang 1:1 tại nguyên tử phospho. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8,00 (s, 1H), 7,1-7,4 (m, 5H),

6,83 (d, 1H), 6,71 (2d, 1H), 5,97 (brs, 2H), 5,94 (d, 1H), 5,07 (2d, 1H), 5,01 (m, 1H), 4,68 (m, 1H), 4,4 (m, 2H), 4,0 (m, 2H), 2,74 (m, 1H), 1,4 (2d, 3H), 1,2-1,3 (12H), 0,98 và 0,99 (2s, 3H). ^{31}P NMR (121,4 MHz, CDCl_3): δ 2,56 và 2,65 (2s). MS = 645,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

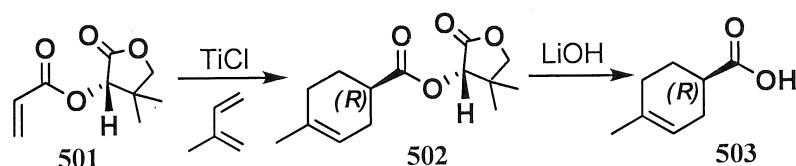
Hợp chất 5 có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 5: Điều chế 5: axit 5-(3,3-dimethylbut-1-yn-1-yl)-3-[(cis-4-hydroxy-4-[(3S)-tetrahydrofuran-3-yloxy]methyl]xyclohexyl){[(1R)-4-methylxyclohex-3-en-1-yl]cacbonyl}amino]thiophen-2-carboxylic 5.



Metyl este của axit 5-(3,3-dimethyl-but-1-ynyl)-3-[(1R)-4-methyl-xyclohex-3-encacbonyl)-(1-oxa-spiro[2,5]oct-6-yl)-amino]-thiophen-2-carboxylic 508 (132 mg, 0,28 mmol) và (S)-tetrahydro-furan-3-ol 509 (247 mg, 2,8 mmol) trong 1-methyl-pyrolidin-2-on (3 mL) được xử lý bằng kali *tert*-butoxit (251 mg, 2,24 mmol), được bịt kín khi được gia nhiệt đến 40°C trong thời gian 16 giờ. Sau khi nguội, hỗn hợp được xử lý bằng HCl 2M cho đến khi độ pH=3, được phân bố giữa etyl axetat và nước và tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch lithi clorua 5%, nước, nước muối, và làm khô qua natri sulfat. Sau khi lọc và cô, phần còn lại được tinh chế bằng HPLC với CH_3CN (0,1% TFA)/ H_2O (0,1% TFA) để thu được 107 mg (hiệu suất 70%) hợp chất 5 dưới dạng bột màu trắng: MS (m/z): 544,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; thời gian lưu HPLC là 4,22 phút (2-98% axetonitril: nước với 0,05% axit trifloaxetic).

Hợp chất trung gian 508 được điều chế như sau.



a. Điều chế hợp chất 502.

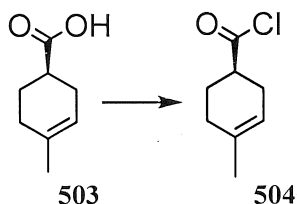
(S)-3-hydroxy-4,4-dimetyldihydrofuran-2(3H)-on (2,60 g, 20 mmol) và diisopropyletylamin (5,2 mL, 30 mmol) trong diclometan (25 mL) được làm lạnh xuống -10°C và được xử lý bằng từng giọt acryloyl clorua (2,03 mL, 25 mmol) và khuấy trong 2 giờ. HCl 1M (20 mL) được bổ sung và rửa lớp hữu cơ bằng natri bicacbonat và nước. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô. Sắc ký nhanh (10-40% EtOAc, hexan) tạo ra 2,09 g (hiệu suất 57%) (S)-4,4-dimetyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl acrylat 501 mong muốn dưới dạng dầu trong.

(S)-4,4-dimetyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl acrylat 501 (2,05 g, 11,1 mmol) trong diclometan (17,5 mL) và hexan (2,5 mL) được làm lạnh xuống -10°C và được xử lý bằng titan tetraclorua (2,2 mL, 1M trong diclometan, 2,2 mmol). Dung dịch màu vàng được khuấy trong thời gian 15 phút và được xử lý bằng cách bổ sung nhỏ giọt isopren (1,67 mL, 16,7 mmol) trong thời gian 5 phút. Sau khi khuấy trong 2 giờ, một phần nữa của isopren (1,67 mL, 16,7 mmol) được bổ sung và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -10 đến 0°C trong thời gian 3,5 giờ. Làm dừng phản ứng bằng amoni clorua (bão hoà trong nước). Nước và etyl axetat: hexan (1:1) được bổ sung. Lớp hữu cơ được tách ra và lớp nước được chiết lại bằng etyl axetat:hexan (1:1). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô qua natri sulfat, được lọc và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký nhanh (10-50% EtOAc:Hex, cột 80 g) để thu được 1,30 g (hiệu suất 46%) (R)-((S)-4,4-dimetyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl) 4-metylxyclohex-3-encarboxylat 502 dưới dạng dầu trong.

b. Điều chế hợp chất 503.

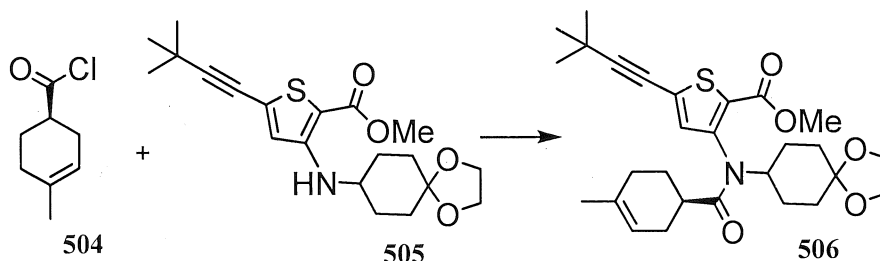
(R)-((S)-4,4-dimetyl-2-oxotetrahydrofuran-3-yl) 4-metylxyclohex-3-encarboxylat 502 (1,30 g, 5,15 mmol) trong THF (10 mL), nước (1 mL) và metanol (1 mL) được xử lý bằng lithi hydroxit monohydrat (2,16 g, 51,5 mmol) và được làm ấm lên nhiệt độ 50°C có khuấy. Sau 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được xử lý bằng HCl 1M. Hỗn hợp được chiết bằng hexan:THF (10:1), làm khô qua natri sulfat, lọc và cô đến 0,738 g (hiệu suất định lượng) axit (R)-4-metylxyclohex-3-encarboxylic 503 dưới dạng bột màu trắng.

c. Điều chế hợp chất 504.



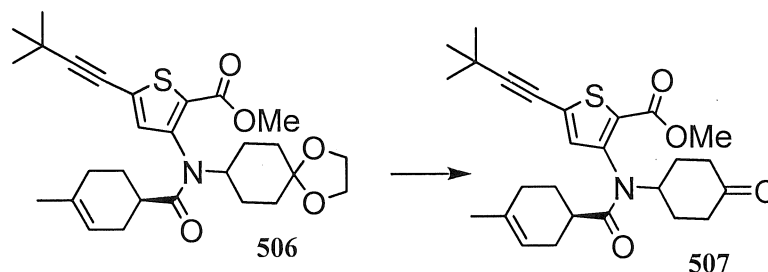
Axit (R)-4-metylcyclohex-3-encarboxylic 503 (371 mg, 2,65 mmol), được làm khô đồng sôi bằng cách làm bay hơi ra khỏi toluen, được xử lý bằng kali phosphat tribazơ (1,13 g, 7,94 mmol), được tạo huyền phù trong diclometan (7,6 mL) và được xử lý bằng dimetylformamit (4 giọt). Làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống 0°C và xử lý bằng từng giọt oxalyl clorua (0,75 mL, 7,9 mmol). Hỗn hợp phản ứng được để ấm lên tới nhiệt độ môi trường trong khi khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau khi lọc chất rắn, dung dịch được cô, được xử lý bằng hexan và cô lại để thu được (R)-4-metylcyclohex-3-encarbonyl clorua 504 dưới dạng dầu màu vàng nhạt mà được sử dụng ngay trong bước tiếp theo.

d. Điều chế hợp chất 506.



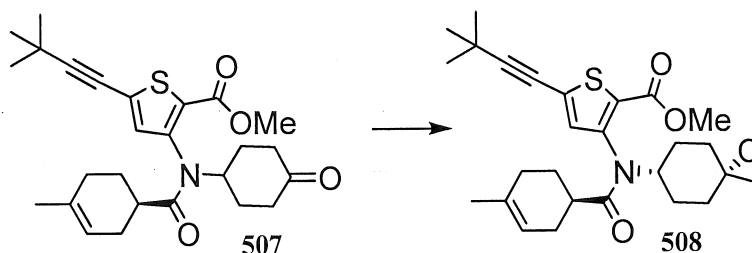
Metyl este của axit (R)-4-metylcyclohex-3-encarbonyl clorua 504 (2,65 mmol), 5-(3,3-dimetyl-but-1-ynyl)-3-(1,4-dioxa-spiro[4,5]dec-8-ylamino)-thiophen-2-carboxylic 505 (250 mg, 0,66 mmol) và kali phosphat tribazơ (562 mg, 2,65 mmol) được tạo huyền phù trong dicloetan (1,7 mL), được bịt kín bằng nắp và được gia nhiệt đến 90°C. Sau 16 giờ, hỗn hợp phản ứng được làm nguội và được phân bố giữa etyl axetat và nước. Lớp hữu cơ được tách ra và lớp nước được chiết lại bằng etyl axetat. Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô qua natri sulfat, được lọc và cô. Sắc ký nhanh (10-40% EtOAc:Hexan) tạo ra 220 mg (hiệu suất 67%) metyl este của axit 5-(3,3-dimetyl-but-1-ynyl)-3-[(1,4-dioxa-spiro[4,5]dec-8-yl)-((1R)-4-metyl-xyclohex-3-encarbonyl)-amino]-thiophen-2-carboxylic 506 mong muốn dưới dạng bột màu be.

e. Điều chế hợp chất 507.



Metyl este của axit 5-(3,3-dimetyl-but-1-ynyl)-3-[(1,4-dioxa-spiro[4,5]dec-8-yl)-((1R)-4-metyl-xyclohex-3-encacbonyl)-amino]-thiophen-2-carboxylic 506 (219 mg, 0,438 mmol) được hòa tan trong THF (3,5 mL) và được xử lý bằng HCl 4M (1,75 mL, 7,01 mmol). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 45°C và khuấy 2 giờ. Etyl axetat được bổ sung và lớp hữu cơ được tách ra, sau đó rửa bằng nước, natri bicacbonat (bão hoà trong nước), nước, và nước muối. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, được lọc và cô đến 0,190 g (hiệu suất 95%) metyl este của axit 5-(3,3-dimetyl-but-1-ynyl)-3-[[((1R)-4-metyl-xyclohex-3-encacbonyl)-(4-oxo-xyclohexyl)-amino]-thiophen-2-carboxylic 507 mong muốn dưới dạng bột màu trắng.

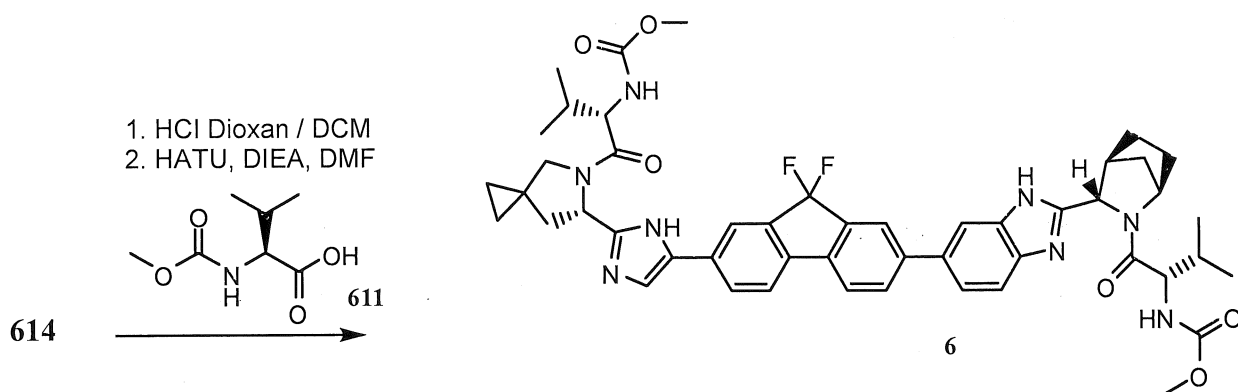
f. Điều chế hợp chất 508.



Trimethylsulfoxoni clorua (79 mg, 0,62 mmol) trong DMSO (1,5 mL) được xử lý bằng natri hydrua (21 mg, thể phân tán dầu 60%, 0,53 mmol) và khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 10 phút. Metyl este của axit 5-(3,3-dimetyl-but-1-ynyl)-3-[[((1R)-4-metyl-xyclohex-3-encacbonyl)-(4-oxo-xyclohexyl)-amino]-thiophen-2-carboxylic 507 trong THF (1 mL + 0,5 mL) được bổ sung từng giọt và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 45 phút. Dung dịch màu da cam được xử lý bằng axit xitric 5% cho đến khi độ pH là 3 và được phân bố giữa nước và etyl axetat. Lớp hữu cơ được tách ra và lớp nước được chiết lại bằng etyl axetat. Chất hữu cơ kết hợp được rửa bằng LiCl 5%, nước và nước muối, và làm khô qua natri sulfat. Sau khi lọc và cô, phần còn lại được tinh chế bằng sắc ký nhanh (20-75% EtOAc:hexan) để thu được 0,134 g (hiệu suất 70%) metyl este của axit 5-(3,3-dimetyl-but-1-ynyl)-3-[[((1R)-4-metyl-xyclohex-3-encacbonyl)-(1-oxa-spiro[2,5]oct-6-yl)-amino]-thiophen-2-carboxylic 508 dưới dạng bột màu trắng.

Hợp chất 6 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và các sản phẩm trung gian như được bộc lộ trong USSN 12/779,023 (US 20100310512 A1). Hợp chất 6 cũng có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

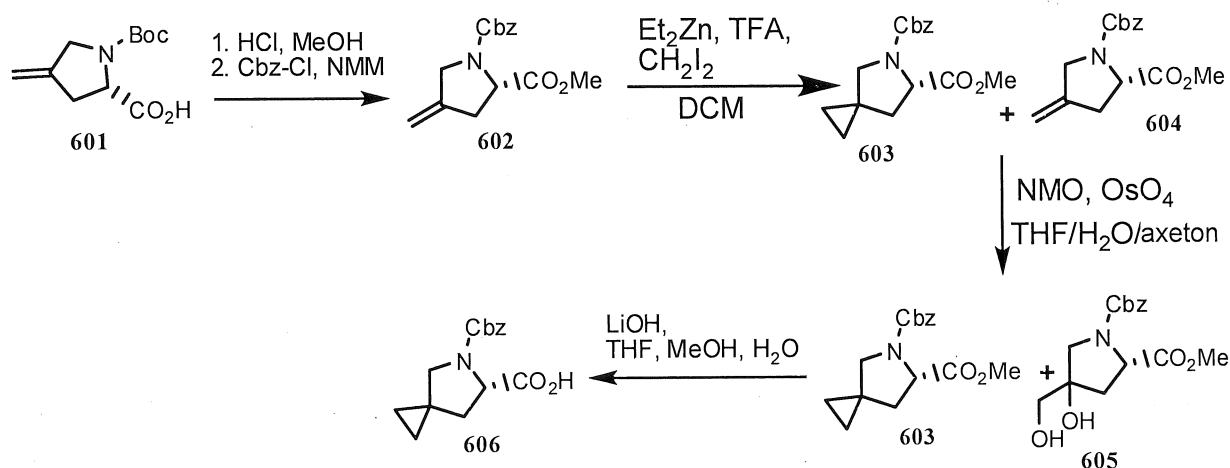
Ví dụ 6: Điều chế methyl este của axit (1-{3-[6-(9,9-diflo-7-{2-[5-(2-metoxycacbonylamino-3-metyl-butyl)-5-aza-spiro[2,4]hept-6-yl]-3H-imidazol-4-yl]-9H-floren-2-yl)-1H-benzoimidazol-2-yl]-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-cacbonyl}-2-metyl-propyl)- carbamic 6.



Tert-butyl este của axit 3-[6-(9,9-diflo-7-{2-[5-(2-metoxycacbonylamino-3-metyl-butyl)-5-aza-spiro[2,4]hept-6-yl]-3H-imidazol-4-yl]-9H-floren-2-yl)-1H-benzoimidazol-2-yl]-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 614 (115 mg, 0,138 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (2 mL) và HCl trong dioxan (4M, 2 mL) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 20 phút, tất cả các chất dễ bay hơi được loại trong chân không. Nguyên liệu thô được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Nguyên liệu thô được hòa tan trong DMF (1,5 mL) và DIEA (53,4 mg, 0,414 mmol) được bổ sung. Dung dịch của axit 2- (L) metoxycacbonylamino-3-metyl-butylric 611 (24,2 mg, 0,138 mmol), HATU (52,4 mg, 0,138 mmol) và DIEA (17,8 mg, 0,138 mmol) trong DMF (1 mL) được bổ sung. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng. Sau 20 phút, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch nước bicarbonat, dung dịch nước LiCl (5%), nước muối, và làm khô qua natri sulfat. Lọc và loại bỏ dung môi trong chân không, tạo ra nguyên liệu thô, mà được tinh chế bằng RP-HPLC (dung môi rửa giải: nước / MeCN w/ 0,1% TFA) để tạo ra hợp chất 6 (76 mg). LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₄₉H₅₄F₂N₈O₆: 888,9 (M⁺); Thực nghiệm: 890,0 (M+H⁺). ¹H-NMR: 300 MHz,

(dmso-d₆) δ : 8,20-7,99 (m, 8H), 7,73 (s, 2H), 7,37 – 7,27 (m, 2H), 5,25 (dd, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,78 (s, 1H) 4,54 (s, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,87 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,55 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 2,75 (m, 1H), 2,25 (m, 2H), 2,09 – 2,04 (m, 2H), 1,88 – 1,79 (m, 2H), 1,54 (m, 1H), 0,94 - 0,77 (m, 15H) 0,63 (m, 4H) ppm. ¹⁹F-NMR: 282 MHz, (dmso-d₆) δ : -109,1 ppm [-74,8 ppm TFA].

Hợp chất trung gian 614 được điều chế như sau.



a. Điều chế hợp chất 1-benzyl este 2-metyl este của axit 4-metylen-pyrrolidin-1,2-dicarboxylic 602.

1-tert-butyl este của axit 4-metylen-pyrrolidin-1,2-dicarboxylic 601 (10,0 g, 44 mmol) được hòa tan trong MeOH (75 mL) ở nhiệt độ trong phòng và HCl (4M trong dioxan, 75 mL) được bổ sung. Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại trong chân không và thu được chất rắn màu be. Nguyên liệu thô được tạo huyền phù trong metylen clorua (100 mL) và N-metyl morpholin (13,3 g, 132 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được làm lạnh xuống 0°C và benzyl clorofomat (8,26 g, 48,4 mmol) được bổ sung trong khi khuấy. Sau 30 phút, hỗn hợp phản ứng được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng, và dung dịch được rửa bằng nước và dung dịch nước HCl (1M). Dung dịch được làm khô qua natri sulfat. Lọc và làm bay hơi dung môi, tạo ra sản phẩm thô, mà được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (dung môi rửa giải: EtOAc / hexan) để thu được hợp chất 602 (10,2 g). LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₁₅H₁₇NO₄: 275,3 (M⁺); Thực nghiệm: 276,4 (M+H⁺).

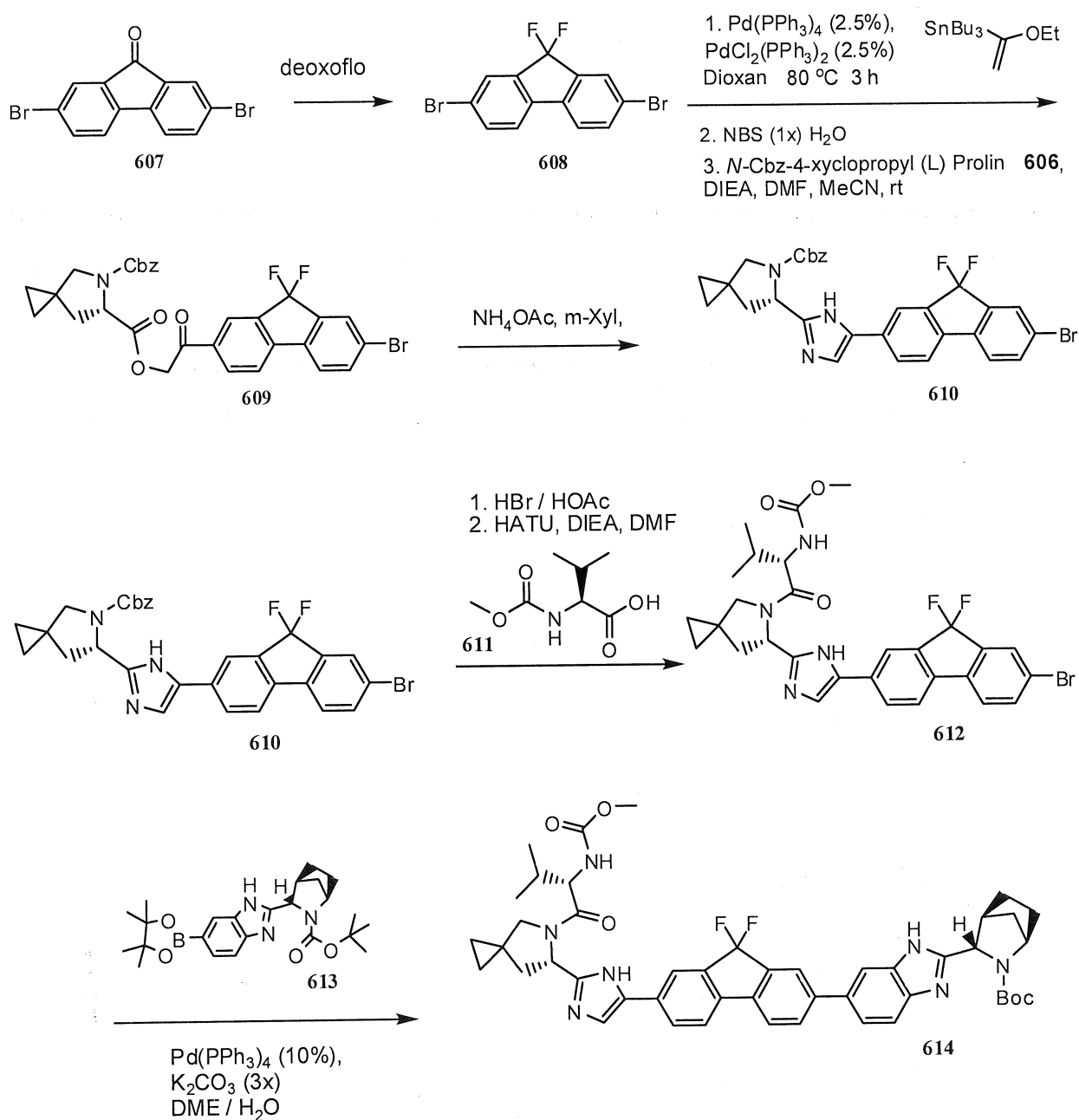
b. Điều chế hỗn hợp của các hợp chất 603 và 604.

Bình đáy tròn 3 cổ được làm khô trong lò được lắp ống nối đầu vào nitơ và phễu bổ sung loại 250 mL. Cổ thứ ba được bịt kín bằng màng ngăn. Cho thanh khuấy, diclometan (120 mL) và dietyl kẽm (1,0M trong hexan, 118 mL, 118 mmol) vào bình, sau đó làm lạnh xuống 0°C trong bể nước đá. Phễu bổ sung được nạp diclometan (40 mL) và axit trifloaxetic (9,1 mL, 118 mmol). Sau khi dung dịch kẽm dietyl được làm lạnh xuống 0°C (khoảng 25 phút), dung dịch axit trifloaxetic được bổ sung từng giọt trong thời gian 20 phút vào hỗn hợp phản ứng được khuấy. Sau khi khuấy trong 20 phút nữa ở nhiệt độ 0°C, diiodometan (9,5 mL, 118 mmol) được bổ sung từ từ trong thời gian 4 phút. Sau 20 phút nữa, 1-benzyl este 2-metyl este của axit 4-metylen-pyrolidin-1,2-dicarboxylic 602 (8,10 g, 29,4 mmol) được bổ sung trong 30 mL diclometan bằng ống thông. Bình chứa 1-benzyl este 2-metyl este của axit 4-metylen-pyrolidin-1,2-dicarboxylic sau đó được rửa bằng 10 mL diclometan khác và dung dịch này cũng được chuyển sang hỗn hợp phản ứng bằng ống thông. Hỗn hợp phản ứng này được để ấm lên tới nhiệt độ trong phòng (RT) và khuấy trong thời gian 110 giờ (khoảng 5 ngày), sau đó chất phản ứng được làm dừng bằng amoni clorua bão hòa trong nước (khoảng 150 mL). Chất chứa trong bình được rót từ từ vào phễu phân tách loại 2 L chứa natri bicacbonat bão hòa trong nước (800 mL). Pha nước được chiết ba lần bằng 300 mL etyl axetat. Chất hữu cơ kết hợp được làm khô qua magie sulfat và cô để tạo ra hỗn hợp của các hợp chất 603 và 604.

c. Điều chế hợp chất 603.

Nguyên liệu thô từ phần b trên đây được hòa tan trong 3:1:1 THF/nước/axeton (165 mL), sau đó được xử lý bằng *N*-metylmorpholin-*N*-oxit (3,45 g, 29,4 mmol) và osmi tetroxit (4% khối lượng trong nước, 5 mL, 0,818 mmol). Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 7 giờ, phản ứng được làm dừng bằng dung dịch nước natri thiosulfat 1M (khoảng 100 mL). Chất chứa trong bình sau đó được rót vào phễu phân tách loại 1 L chứa nước (khoảng 300 mL). Pha nước được chiết ba lần bằng 300 mL diclometan. Chất hữu cơ kết hợp được làm khô qua magie sulfat và cô. Tinh chế phần thô còn lại bằng cột sắc ký silic oxit (5% đến 45% EtOAc/hexan) để tạo ra 5-benzyl este 6-metyl este của axit 5-aza-spiro[2,4]heptan-5,6-dicarboxylic 603 dưới dạng dầu trong (5,54g, 19,15 mmol, 65%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,36-7,29 (m, 5H), 5,21-5,04 (m, 2H), 4,56-4,47 (m, 1H), 3,75 (s, 1,5H), 3,60 (m, 1,5H), 03,51-3,37 (m, 2H), 2,32-2,25 (m, 1H), 1,87-1,80 (m, 1H), 0,64-0,51 (m, 4H).

d. Điều chế 5-benzyl este của axit 5-aza-spiro[2,4]heptan-5,6-dicarboxylic 606. 5-benzyl este 6-metyl este của axit 5-aza-spiro[2,4]heptan-5,6-dicarboxylic 603 (244 mg, 0,840 mmol) được hòa tan trong THF (2,0 mL) / MeOH (1,5 mL). Dung dịch nước LiOH (35,5 mg, 0,84 mmol) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng được trung hoà bằng dung dịch nước HCl (1M) và dung môi hữu cơ được loại bỏ trong chân không. Hỗn hợp thô được pha loãng bằng nước và EtOAc và lớp hữu cơ được thu gom. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại trong chân không và axit thô 606 được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₁₅H₁₇NO₄: 275,3 (M⁺); Thực nghiệm: 276,3 (M+H⁺).



e. Điều chế 2,7-dibromo-9,9-diflo-9H-floren 608.

2,7-dibromo-floren-9-on 607 (4,0 g, 11,8 mmol) được tạo huyền phù trong deoxoflo (12 mL) ở nhiệt độ trong phòng và EtOH (4 giọt) được bổ sung. Huyền phù đã được khuấy được gia nhiệt ở nhiệt độ $T = 90^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 giờ (THẬN TRỌNG: việc sử dụng deoxoflo ở nhiệt độ cao, như được nêu trên đây, cần phải thận trọng vì sự toả nhiệt nhanh và mạnh có thể xảy ra). Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và rót lên trên nước đá chứa natri bicacbonat. Chất rắn được tạo thành và được thu gom bằng cách lọc. Nguyên liệu thô được chuyển vào EtOAc và được rửa bằng dung dịch nước HCl (1M) và nước muối. Dung dịch được làm khô qua natri sulfat. Lọc và làm bay hơi dung môi tạo ra sản phẩm thô, mà được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (dung môi rửa giải: EtOAc / hexan) để tạo ra 608 (3,2 g). ^{19}F -NMR: 282 MHz, (dmso- d_6) δ : -111,6 ppm. Trước khi sử dụng nguyên liệu trong bước tiếp theo, nó được cho tiếp xúc ở dạng dung dịch trong EtOAc với than.

f. Điều chế 5-benzyl este 6-[2-(7-bromo-9,9-diflo-9H-floren-2-yl)-2-oxo-etyl] este của axit 5-aza-spiro[2,4]heptan-5,6-dicarboxylic 609.

2,7-dibromo-9,9-diflo-9H-floren 608 (372 mg, 1,04 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (30,0 mg, 0,026 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (18,2 mg, 0,026 mmol), $\text{As}(\text{PPh}_3)_3$ (5,0 mg) được hòa tan trong dioxan (10 mL) trong môi trường argon. Etoxyvinyl-tributyl thiếc (376,4 mg, 1,04 mmol) được bổ sung. Gia nhiệt hỗn hợp trong thời gian 140 phút ở nhiệt độ 85°C (bể dầu). Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng. *N*-bromo suxinimit (177 mg, 1,0 mmol) được bổ sung, sau đó là nước (2 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ, sau đó phần lớn dioxan được loại bỏ trong chân không. Hỗn hợp phản ứng thô được pha loãng bằng EtOAc và được rửa bằng nước. Tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ trong chân không. Toluene được bổ sung và tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ trong chân không lần thứ hai. Nguyên liệu thô được hòa tan trong DMF / MeCN (2 mL, 1:1) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch của *N*-Cbz-4-xyclopropyl (*L*) prolin 606 (0,84 mmol) và DIEA (268 mg, 2,08 mmol) trong MeCN (2 mL) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 14 giờ, hầu hết MeCN được loại bỏ trong chân không và hỗn hợp phản ứng thô được pha loãng bằng EtOAc. Hỗn hợp được rửa bằng dung dịch nước HCl (1M), dung dịch nước LiCl (5%), nước muối, và được làm khô qua natri sulfat. Lọc và làm bay hơi dung môi, tạo ra sản phẩm phản ứng thô, mà được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel

(dung môi rửa giải: EtOAc / hexan) để thu được hợp chất 609 (176 mg). LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₃₀H₂₄BrF₂NO₅: 596,4 (M⁺); Thực nghiệm: 595,2 / 597,2 (M+H⁺).

g. Điều chế benzyl este của axit 6-[5-(7-bromo-9,9-diflo-9H-floren-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]-5-aza-spiro[2,4]heptan-5-carboxylic 610.

5-benzyl este 6-[2-(7-bromo-9,9-diflo-9H-floren-2-yl)-2-oxo-etyl] este của axit 5-aza-spiro[2,4]heptan-5,6-dicarboxylic 609 (172 mg, 0,293 mmol) được hòa tan trong *m*-xylen (6,0 mL). Amoni axetat (226 mg, 2,93 mmol) được bổ sung và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 140°C trong thời gian 60 phút trong điều kiện vi sóng. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và tất cả các chất dễ bay hơi được loại trong chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (dung môi rửa giải: EtOAc / hexan) để thu được hợp chất 610 (80,3 mg). LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₃₀H₂₄BrF₂N₃O₂: 576,4 (M⁺); Thực nghiệm: 575,2 / 577,2 (M+H⁺).

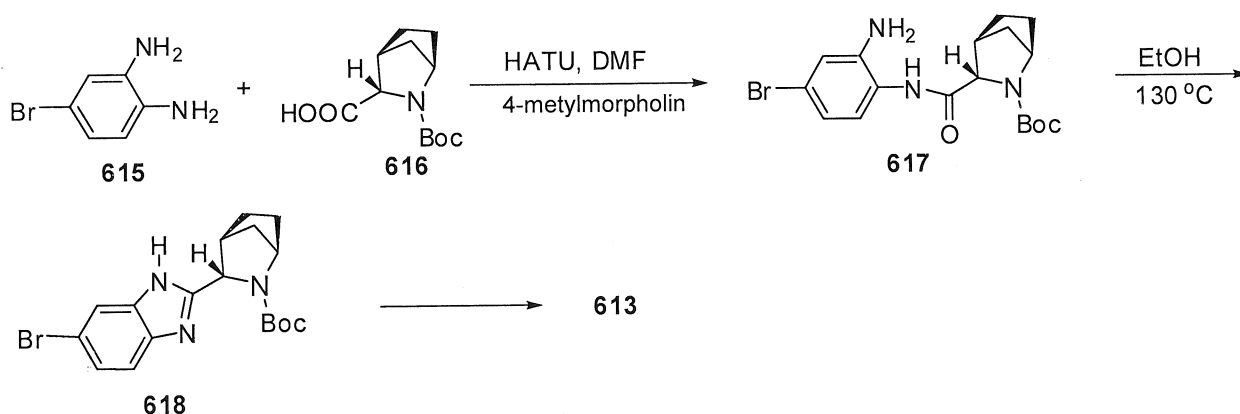
h. Điều chế metyl este của axit (1-{6-[5-(7-bromo-9,9-diflo-9H-floren-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]-5-aza-spiro[2,4]heptan-5-cacbonyl}-2-metyl-propyl)-carbamic 612.

Benzyl este của axit 6-[5-(7-bromo-9,9-diflo-9H-floren-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]-5-aza-spiro[2,4]heptan-5-carboxylic 610 (800 mg, 1,38 mmol) được hòa tan trong metylen clorua (15 mL), và HBr trong AcOH (37%, 2 mL) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 180 phút, huyền phù được pha loãng bằng hexan và chất rắn được thu gom bằng cách lọc và được rửa bằng hexan và được đưa vào chân không. Nguyên liệu thô được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Nguyên liệu thô được hòa tan trong DMF (4,0 mL) và DIEA (356 mg, 2,76 mmol) được bổ sung. Dung dịch của axit 2-(L)-metoxycacbonylamino-3-metyl-butyric 611 (242 mg, 1,38 mmol), HATU (524 mg, 1,38 mmol) và DIEA (178 mg, 1,38 mmol) trong DMF (1 mL) được bổ sung. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng. Sau 50 phút, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch nước bicacbonat, dung dịch nước LiCl (5%), nước muối, và được làm khô qua natri sulfat. Lọc và loại bỏ dung môi trong chân không, tạo ra nguyên liệu thô, mà được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (dung môi rửa giải: EtOAc / hexan) để tạo ra hợp chất lần ít tạp chất 612 (878 mg). LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₂₉H₂₉BrF₂N₄O₃: 599,5 (M⁺); Thực nghiệm: 598,5 / 600,5 (M+H⁺).

i. Điều chế *tert*-butyl este của axit 3-[6-(9,9-diflo-7-{2-[5-(2-metoxycacbonylamino-3-metyl-butyl)-5-aza-spiro[2,4]hept-6-yl]-3H-imidazol-4-yl}-9H-floren-2-yl)-1H-benzoimidazol-2-yl]-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 614.

Metyl este của axit (1-{6-[5-(7-bromo-9,9-diflo-9H-floren-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]-5-aza-spiro[2,4]heptan-5-cacbonyl}-2-metyl-propyl)-carbamic 612 (840 mg, 1,4 mmol), *tert*-butyl este của axit 3-[6-(4,4,5,5-tetrametyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-1H-benzoimidazol-2-yl]-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 613 (615 mg, 1,4 mmol), Pd(PPh₃)₄ (161 mg, 0,14 mmol), K₂CO₃ (579 mg, 4,2 mmol), được hòa tan trong DME (15 mL) / nước (3 mL) trong môi trường argon. Gia nhiệt hỗn hợp trong thời gian 120 phút ở 85 – 90°C (bể dầu). Sau 120 phút, bổ sung boronat este (61 mg, 0,14 mmol) được bổ sung và tiếp tục gia nhiệt. Sau 3 giờ, làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng. Hầu hết DME được loại bỏ trong chân không và hỗn hợp phản ứng thô được pha loãng bằng EtOAc. Hỗn hợp được rửa bằng nước muối và được làm khô qua natri sulfat. Lọc và làm bay hơi dung môi, tạo ra sản phẩm phản ứng thô, mà được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel (dung môi rửa giải: EtOAc / hexan) để thu được hợp chất 614 (878 mg). LCMS-ESI⁺: theo tính toán cho C₄₇H₅₁F₂N₇O₅: 831,9 (M⁺); Thực nghiệm: 832,7 (M+H⁺).

Hợp chất trung gian 613 có thể được điều chế như sau



j. Điều chế *tert*-butyl este của axit 3-(2-Amino-4-bromo-phenylcarbonyl)-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 617.

Bổ sung HATU (0,543g, 1,05 đương lượng) vào dung dịch của 2-*tert*-butyl este của axit 2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2,3-dicarboxylic 616 (0,327 g, 1,36 mmol, 1 đương lượng), 4-bromo-benzen-1,2-diamin 615 (0,507 g, 2,71 mmol, 2 đương lượng)

và 4-metylmorpholin (0,299 mL, 2 đương lượng) trong 10 mL DMF. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó cô. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng etyl axetat và rửa bằng dung dịch nước NaHCO₃ loãng và nước muối. Lớp hữu cơ được cô và được tinh chế bằng cột sắc ký nhanh (silicagel, 20 đến 80% etyl axetat/hexan) để thu được hỗn hợp của chất đồng phân vị trí *tert*-butyl este của axit 3-(2-Amino-4-bromo-phenylcarbamoyl)-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 617.

k. Điều chế *tert*-butyl este của axit 3-(6-bromo-1H-benzoimidazol-2-yl)-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 618.

Hỗn hợp của chất đồng phân vị trí *tert*-butyl este của axit 3-(2-Amino-4-bromo-phenylcarbamoyl)-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 617 nêu trên được hòa tan trong etanol và được gia nhiệt đến 130°C trong ống kín qua đêm và tiếp tục gia nhiệt ở nhiệt độ 170°C trong thời gian 3 ngày. LC-MS cho thấy sản phẩm mong muốn và sản phẩm bị phân cắt Boc (tỷ lệ khoảng 1:1) được tạo thành. Hỗn hợp này được cô và được hòa tan trong HCL. Di-*tert*-butyl dicacbonat (0,6 đương lượng) được bổ sung và khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Cô hỗn hợp phản ứng và tinh chế bằng cột sắc ký nhanh (silicagel, 20 đến 80% etyl axetat/hexan) để thu được *tert*-butyl este của axit 3-(6-bromo-1H-benzoimidazol-2-yl)-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 618 (0,383 g, 72%) dưới dạng bột màu da cam.

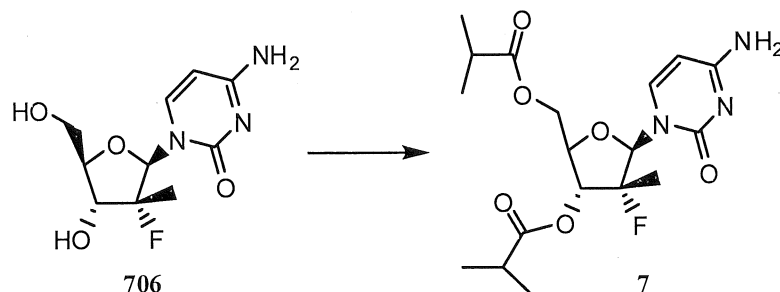
l. Điều chế hợp chất 613.

Hỗn hợp của *tert*-butyl este của axit 3-(6-bromo-1H-benzoimidazol-2-yl)-2-aza-bixyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 618 (264 mg, 0,673 mmol), dipinocal este của axit benzen-1,4-diboronic (5 đương lượng, 3,36 g, 6,95 mmol), tetrakis(triphenylphosphin)paladi (5%, 39 mg) và dung dịch nước kali cacbonat 2M (3 đương lượng, 1,01 mL) trong 5 mL DME được gia nhiệt đến 90°C trong môi trường Ar trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội và được pha loãng trong etyl axetat và rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Lớp hữu cơ được làm khô (MgSO₄), được cô và được tinh chế bằng cột sắc ký nhanh (silicagel, 20 đến 60% etyl axetat/hexan) để thu được *tert*-butyl este của axit 3-{6-[4-(4,4,5,5-tetrametyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenyl]-1H-benzoimidazol-2-yl}-2-aza-

bicyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylic 613 (295 mg, hiệu suất 85%). LCMS-ESI: theo tính toán cho $C_{30}H_{38}BN_3O_4$: 515,45; Thực nghiệm: 516,1 ($M+H^+$).

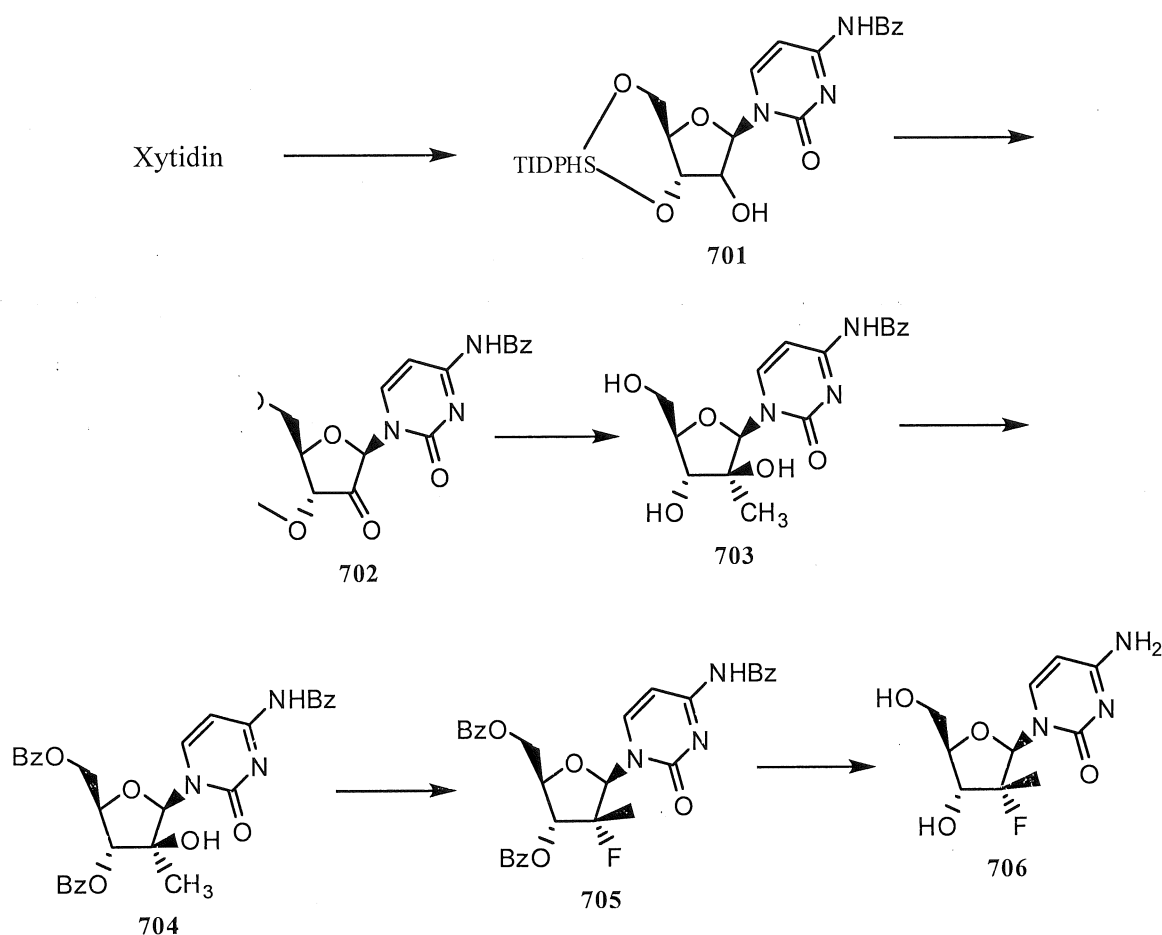
Hợp chất 7 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và các sản phẩm trung gian như được bộc lộ trong US 7,429,572. Hợp chất 7 cũng có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 7: Điều chế hợp chất 7.



Bổ sung TEA (2,3 kg, 16,5 mol) và nước (7 L) vào huyền phù trong nước đá lạnh của hợp chất 701 (970 g, 3,74 mol) và DMAP (50 g, 0,412 mol) trong THF (10 L) để tạo ra dung dịch trong suốt. Isobutyryl clorua (3 đương lượng) được bổ sung từ từ vào hỗn hợp có khuấy trong khi vẫn duy trì nhiệt độ ở khoảng 0°C . 1,2 đương lượng, sau đó là 0,7 đương lượng nữa của isobutyl clorua được bổ sung cho đến khi HPLC cho thấy phản ứng đã diễn ra về cơ bản là hoàn toàn (tổng cộng khoảng 1,95 kg). Hỗn hợp phản ứng được axit hóa bằng HCl đặc đến độ pH bằng khoảng 6,4 và pha hữu cơ được rửa bằng EtOAc (2 x 10 L). Các phần chiết kết hợp được rửa bằng nước (1 x 15 L). Pha hữu cơ được lọc và cô trong chân không. Phần còn lại được hòa tan trong IPA (khoảng 20 kg) và heptan (14,2 kg) được bổ sung. Dung dịch được gia nhiệt đến khoảng $74-75^{\circ}\text{C}$ để tạo ra dung dịch trong suốt, sau đó khoảng 5 L được loại ra bằng cách chưng cất. Dung dịch thu được được làm nguội từ từ đến nhiệt độ trong phòng. Chất kết tủa được tạo ra ở khoảng $42-43^{\circ}\text{C}$. Liên tục làm nguội từ từ xuống 5°C , sau đó khuấy qua đêm. Chất rắn thu được được lọc và phần dịch lọc được rửa bằng hỗn hợp IPA/heptan (1:8) (13,4 kg), và làm khô trong chân không ở nhiệt độ khoảng $60-70^{\circ}\text{C}$ để thu được 1,295 kg (86,65%) hợp chất 7 có độ tinh khiết là 99,45% theo HPLC.

Hợp chất trung gian 706 có thể được điều chế như sau.



a. Điều chế hợp chất 701.

Bổ sung anhydrit benzoic (102,4 g, 0,452 mol) vào huyền phù chứa xytidin (100 g, 0,411 mol) trong DMF (2,06 L). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ. DMF được loại bỏ trong chân không và phần còn lại được nghiền với dietyl ete. Chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc hút và rửa bằng dietyl ete (2 x 200 mL). Tiếp tục làm khô trong chân không ở nhiệt độ trong phòng, tạo ra *N*⁴ benzamit (140,6 g, 98,3%). Một phần của nguyên liệu này (139,3 g, 0,401 mol) được hòa tan trong pyridin khan (1,2 L) và được xử lý bằng 1,3-diclo-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan (141,4 mL, 0,441 mol) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp được cô đến gần khô trong chân không và được làm bay hơi đồng thời với toluen (3 x 200 mL). Phần còn lại được xử lý bằng EtOAc (1,8 L) và rửa bằng HCl (2 x 200 mL, 0,05N), NaHCO₃ (5%, 2 x 400 mL). Lớp hữu cơ được rửa, làm khô (Na₂SO₄), lọc, và làm bay hơi cho đến khi khô. Hợp chất 701 (256,5 g, >100%) được tách dưới dạng bột màu trắng và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

b. Điều chế hợp chất 702.

Hợp chất 701 (236,5 g, 0,40 mol) được hòa tan trong THF khô (1,22 L). DMSO khan (180,8 mL, 2,1 mol) được bổ sung và dung dịch thu được được làm nguội xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -15°C . Anhydrit trifloaxetic (90,6 mL, 0,64 mol) được bổ sung từng giọt trong thời gian 45 phút và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -15°C trong thời gian 2 giờ, sau đó triethylamin khan (223,5 mL, 1,6 mol) được bổ sung trong thời gian 20 phút. Hỗn hợp phản ứng thô chứa keton 702 được hòa tan trong EtOAc (500 mL), và dung dịch thu được được rửa bằng H_2O (3 x 400 mL), làm khô (Na_2SO_4) và dung môi được loại trong chân không để thu được chất rắn màu vàng mà được tinh chế trên cột silicagel, rửa giải bằng gradien từng bước của Et_2O (0-60%) trong hexan, sau đó là gradien từng bước của EtOAc (50-100%) trong hexan. Keton thô thu được theo cách này (khoảng 192 g) được kết tinh từ ete dầu mỏ để thu được keton 702 (138,91 g, 57,5% từ xytidin) dưới dạng chất rắn màu trắng và 22 g nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng, 701, dưới dạng chất rắn màu vàng.

c. Điều chế hợp chất 703.

Hợp chất 702 (48,57 g, 8,26 mmol) được hòa tan trong toluen khan (khoảng 400 mL) và loại bỏ dung môi trong chân không cùng với việc loại bỏ hơi ẩm. Sau đó, phần còn lại được tiếp tục làm khô trong chân không (bơm dầu) trong 2 giờ nữa. Với việc loại bỏ triệt để hơi ẩm, bột dư được hòa tan trong diethyl ete khan (1,03 L) trong môi trường argon. Dung dịch thu được được làm lạnh xuống -78°C trong môi trường argon và MeLi (1,6M, 258,0 mL, 0,413 mol) được bổ sung từng giọt qua phễu bổ sung. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ -78°C . Dung dịch nước NH_4Cl 1M (500 mL) được bổ sung từ từ. Sau khi ấm lên đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được rửa bằng H_2O (2 x 500 mL), làm khô (Na_2SO_4), và sau đó được cô tới khô để thu được bột màu nâu (khoảng 60 g, >100%).

Phản ứng được tiến hành hai lần nữa bằng cách sử dụng 37,62 g và 56,4 g hợp chất 702. Sản phẩm thô kết hợp (128,0 g, 0,212 mol) được hòa tan trong THF (1,28 L) và được xử lý bằng HOAc đậm đặc (23 mL, 0,402 mol). Bổ sung TBAF (384,0 mL, 1M trong THF) vào dung dịch này. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 0,75 giờ và hỗn hợp được xử lý bằng silicagel (750 g) và cô tới khô. Bột được tải lên trên cột silicagel được đóng gói trong CH_2Cl_2 . Rửa giải bằng 1:7 EtOH- CH_2Cl_2 , tạo ra chất sáp rắn tối màu mà được hấp phụ trước trên silicagel (300 g)

và được tiến hành sắc ký như được mô tả trên đây. Hợp chất 703 (46,4 g, 53,0% từ 702) được tách dưới dạng chất rắn màu trắng nhò. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,20 (s, 3H, CH_3), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,73-3,78 (m, 2H), 5,19 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz), 7,50 (ψ t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 7,62 (ψ , 1H, $J = 7,3$ Hz), 8,00 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz), 8,14 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Tính toán theo phân tích đối với $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Thực nghiệm: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

d. Điều chế hợp chất 704.

Hợp chất 703 (46,0 g, 0,13 mol) được hòa tan trong pyridin khan và cô tới khô trong chân không. Sirô thu được được hòa tan trong pyridin khan trong môi trường argon và làm lạnh xuống 0°C có khuấy. Dung dịch màu nâu được xử lý bằng cách nhỏ giọt benzoyl clorua (30 mL, 0,250 mol) trong thời gian 10 phút. Bể nước đá được lấy ra và tiếp tục khuấy trong thời gian 1,5 giờ, bằng cách đổ TLC cho thấy không còn nguyên liệu ban đầu. Hỗn hợp được làm ngừng bằng cách bổ sung nước (5 mL) và cô tới khô. Phần còn lại được hòa tan trong lượng tối thiểu của CH_2Cl_2 và rửa bằng NaHCO_3 bão hoà (1 x 500 mL) và H_2O (1 x 500 mL). Pha hữu cơ được làm khô (Na_2SO_4) và được lọc, được cô tới khô và được tiến hành sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng gradien từng bước của EtOAc-hexan (25-60%) để tạo ra hợp chất 704 dưới dạng bột màu vàng (48,5 g, 67%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,64 (s, 3H, CH_3), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5', 5a'), 5,50 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1'), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz). Tính toán theo phân tích đối với $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{NO}_8$: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38. Thực nghiệm: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

e. Điều chế hợp chất 705.

Hợp chất 704 (7,50 g, 0,013 mol) được hòa tan trong toluen khan (150 mL) trong môi trường argon và làm lạnh xuống -20°C . DAST (2,5 mL, 18,9 mmol) được bổ sung từ từ và bể làm lạnh được lấy ra sau khi hoàn thành việc bổ sung. Tiếp tục khuấy trong thời gian 1 giờ và rót hỗn hợp vào NaHCO_3 bão hoà (100 mL) và rửa cho đến khi sự thoát khí ngừng lại. Pha hữu cơ được làm khô (Na_2SO_4), cô, và được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng 1:1 EtOAc-hexan. Thu được 1,22 g (16,3%) 705 tinh khiết dưới dạng chất rắn màu trắng. Điểm nóng chảy (mp) 241°C

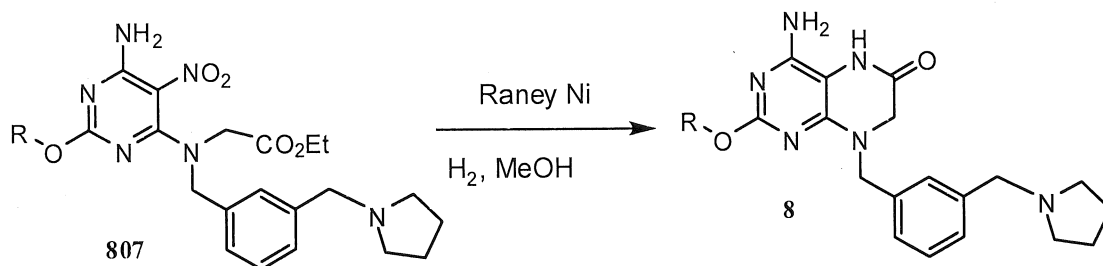
(CH₂Cl₂-hexan); ¹H NMR (CDCl₃): δ 1,49 (d, 3H, *J*=22,4 Hz, CH₃), 4,64 (dd, 1H, *J* = 3,44, 12,9 Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, *J* = 2,4, 12,7 Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, *J* = 8,6, 20,7 Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, *J* = 18,0 Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (bs, 1H, NH). ¹⁹F NMR (CDCl₃): δ 3,3 (m). Tính toán theo phân tích đối với C₃₁H₂₆FN₃O₇ • 0,7 H₂O: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Thực nghiệm: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

f. Điều chế hợp chất 706.

Hợp chất 705 (6,30 g, 0,011 mol) được tạo huyền phù trong dung dịch amoniac trong metanol (khoảng 7N, 150 mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Loại bỏ dung môi trong chân không, làm bay hơi đồng thời với metanol (1 x 20 mL), và hấp phụ trước lên trên silicagel. Bột màu trắng được tải lên trên cột silicagel (được đóng gói trong CHCl₃) và cột được rửa giải bằng 9% EtOH trong CHCl₃, sau đó là 17% EtOH và cuối cùng là 25% EtOH trong CHCl₃. Cô phân đoạn chứa sản phẩm, lọc qua đĩa 0,4 μm, và làm đông khô từ nước tạo ra hợp chất 706, 2,18 g (76%). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1,17 (d, 3H, *J* = 22,3 Hz, CH₃), 3,63 (dd, 1H, *J* = 2,7, 13,7 Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (app s, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, *J* = 7,71 Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, *J* = 18,9 Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH₂), 7,42 (s, 1H, NH₂), 7,90 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-6). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ 2,60 (m). Tính toán theo phân tích đối với C₁₀H₁₄FN₃O₄ • 1,4 H₂O: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Thực nghiệm: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. Hợp chất 706 (0,10 g, 0,386 mmol) được chuyển hóa thành muối hydroclorua bằng cách hòa tan trong nước (2 mL) và điều chỉnh độ pH đến khoảng 3,0 bằng HCl 1M. Nước được loại bỏ trong chân không và phần còn lại được kết tinh từ nước EtOH để thu được hợp chất 706 dưới dạng muối hydroclorua (71,0 mg). Mp 243°C (phân hủy); ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1,29 (d, 3H, *J* = 22,6 Hz, CH₃), 3,65 (dd, 1H, *J* = 2,3, 12,7 Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, *J* = 17,3 Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, H-6), 8,69 (s, 1,5H, NH), 9,78 (s, 1,5H, NH). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ 1,69 (m). Tính toán theo phân tích đối với C₁₀H₁₄FN₃O₄ • HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Thực nghiệm: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

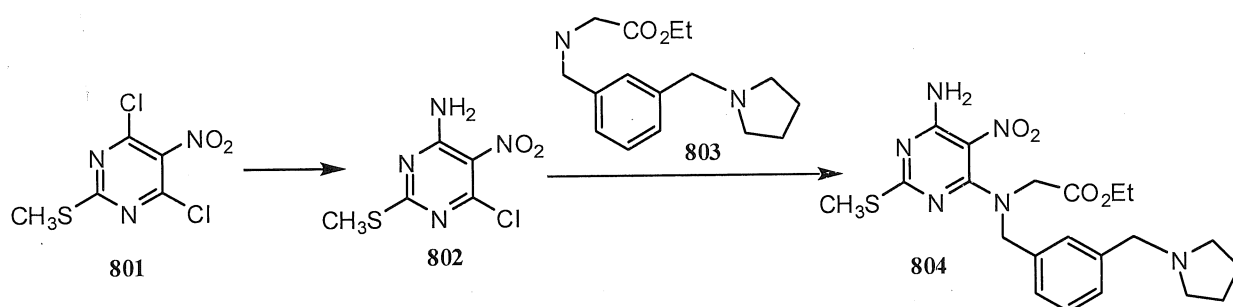
Hợp chất 8 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và các sản phẩm trung gian như được bộc lộ trong USSN 12/632,194. Hợp chất 8 cũng có thể được điều chế như được nêu trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 8: Điều chế 4-amino-2-*n*-butoxy-8-[3'-(pyrrolidin-1''-ylmetyl)-benzyl]-5,6,7,8-tetrahydropteridin-6-on 8. (R = *n*-butyl)



Bổ sung Niken Raney (khoảng 200 μ L, huyền phù đặc trong H_2O) vào dung dịch của hợp chất nitro 807 (730 mg, 1,5 mmol) trong MeOH (10 mL). Bình phản ứng được sục H_2 và sau đó được khuấy trong môi trường khí H_2 trong thời gian 1,5 giờ. Hỗn hợp được lọc qua xelit với CH_2Cl_2 và MeOH (1:1). Cô phần dịch lọc trong chân không và để trên máy làm đông khô qua đêm. Thu được bazơ tự do của hợp chất 8 dưới dạng chất rắn màu trắng. Để thu được muối HCl của hợp chất 8, mẫu của phần dịch lọc trên đây được pha với HCl 1,0M tới độ pH = 1-2 và được làm đông khô. 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7,65 (s, 1H), 7,50 (m, 3H), 4,96 (s, 2H), 4,44 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 3,48 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 2,02-2,17 (m, 4H), 1,74 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 0,94 (t, $J = 7$ Hz, 3H) - [Muối HCl]. LCMS-ESI $^+$: theo tính toán cho $C_{22}H_{31}N_6O_2$: 411,5 ($M+H^+$); Thực nghiệm: 411,3 ($M+H^+$).

Hợp chất trung gian 807 được điều chế như sau.

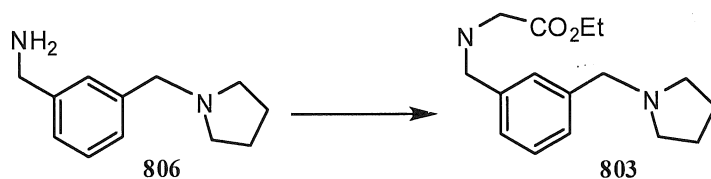


a. Điều chế hợp chất 802.

Bổ sung Et_3N (3,14 mL, 22,5 mmol), sau đó là dung dịch của NH_3 (2,0M trong MeOH, 5,4 mL, 11 mmol) vào dung dịch của hợp chất 801 (2,46 g, 10,2 mmol) trong THF (34 mL) ở nhiệt độ $-20^\circ C$. Khuấy hỗn hợp trong khi ấm lên đến $0^\circ C$ trong thời

gian 1,5 giờ (LC/MS cho thấy sự tiêu thụ nguyên liệu ban đầu). Hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất 802 được dùng trong bước tiếp theo mà không cần xử lý thêm.

b. Điều chế hợp chất 803.

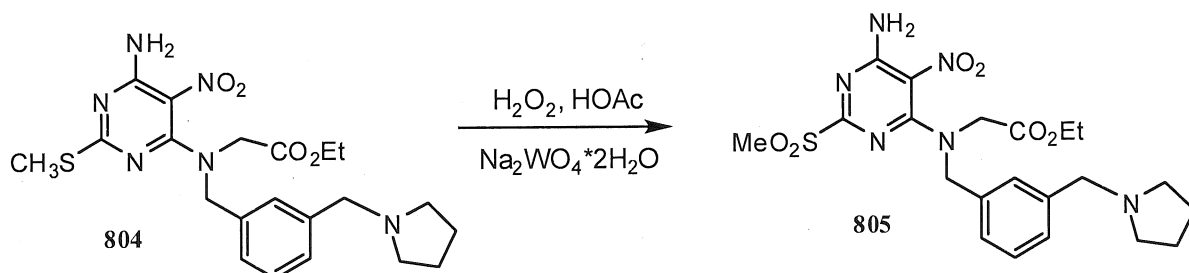


Bổ sung từng giọt Et_3N (3,14 mmol, 22,5 mmol), sau đó là methyl bromoacetat (1,04 mL, 22,3 mmol) vào dung dịch của 3-((1-pyrrolidinylmethyl)phenyl)metanamin 806 (1,95 g, 10,2 mmol) trong THF (34 mL) ở nhiệt độ 0°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng cho đến khi LC/MS cho thấy sự tiêu thụ nguyên liệu ban đầu, trong thời gian khoảng 2 giờ. Hỗn hợp chứa hợp chất 803 được dùng trong bước tiếp theo mà không cần xử lý thêm.

c. Điều chế hợp chất 804.

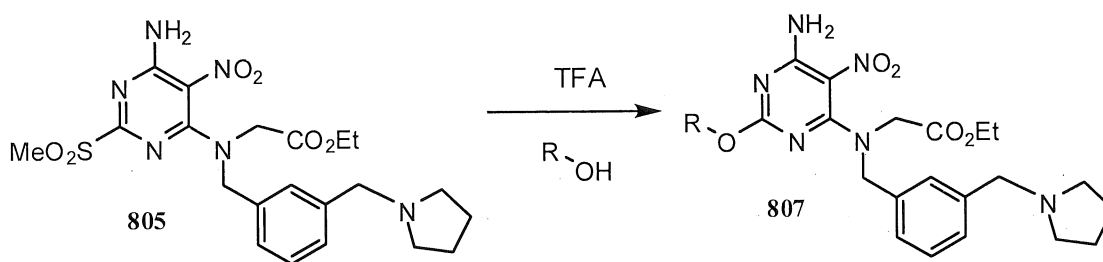
Hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất 803 được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất 802 ở nhiệt độ 0°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng cho đến khi LC/MS cho thấy sự tiêu thụ hợp chất 802, trong thời gian khoảng 45 phút. Dung dịch bão hòa của NH_4Cl (50 mL) được bổ sung. Các lớp được tách, và lớp nước được chiết bằng EtOAc (2 x 30 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô qua MgSO_4 , lọc, và cô trong chân không. Tinh chế bằng sắc ký trên silicagel, tạo ra 2,11 g hợp chất 804. ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ (ppm) 7,32-7,16 (m, 4H), 4,69 (s, 2H), 4,19 (q, $J = 7$ Hz, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,60 (s, 2H), 2,49 (m, 4H), 2,40 (s, 3H), 1,78 (m, 4H), 1,23 (t, 3 H, $J = 7$ Hz). LCMS-ESI $^+$: theo tính toán cho $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$: 461,2 ($\text{M}+\text{H}^+$); Thực nghiệm: 461,0 ($\text{M}+\text{H}^+$).

d. Điều chế ethyl- N_α -[4-amino-2-metansulfonyl-5-nitropyrimidin-6-yl], N_α -[3'-(pyrrolidin-1''-ylmethyl)-benzyl]-glyxinat 805.



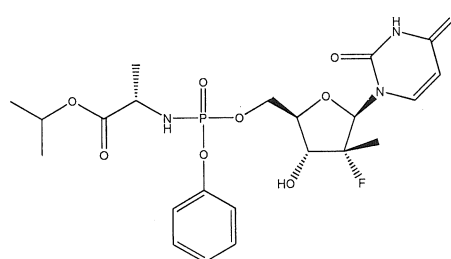
Bổ sung lần lượt natri vonframmat dihydrat (792 mg, 2,40 mmol), axit axetic (4,6 mL, 80 mmol), và hydro peroxit (3,4 mL, khoảng 40 mmol, 35% khối lượng trong H₂O) vào huyền phù của hợp chất sulfua 804 (3,68 g, 8,00 mmol) trong EtOH (40 mL) ở nhiệt độ 0°C. Sau 3 giờ, bổ sung thêm axit axetic (4,6 mL) và hydro peroxit (3,4 mL). Hỗn hợp phản ứng được duy trì ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 16 giờ. Dung dịch bão hòa của Na₂SO₃ (50 mL) được bổ sung một cách cẩn thận ở nhiệt độ 0°C, sau đó là CH₂Cl₂ (75 mL). Các lớp được tách, và lớp nước được chiết bằng CH₂Cl₂ (4 x 50 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô qua MgSO₄, lọc, và cô trong chân không để tạo ra nguyên liệu chứa hợp chất 805 mà được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

e. Điều chế hợp chất 807. (R = n-butyl)



Bổ sung TFA (470 µL, 6,1 mmol) vào dung dịch của hợp chất sulfon 805 (1,0 g, 2,0 mmol) trong n-butanol (10 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được rót vào dung dịch bão hòa của NaHCO₃ (20 mL) và CH₂Cl₂ (30 mL). Các lớp được tách, và lớp nước được chiết bằng CH₂Cl₂ (30 mL). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô qua MgSO₄, lọc, và cô trong chân không. Tiến hành tinh chế bằng cách sắc ký trên silicagel (1 g cơ chất/10 g SiO₂) (2-15% MeOH/CH₂Cl₂) để tạo ra hợp chất 807.

Ví dụ 9: Điều chế hợp chất 9 (từ US2010/0298257)



9

Điều chế isopropyl este của axit (S)-2-{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-4-(R)-flo-3-hydroxy-4-metyl-tetrahydro-furan-2-yl-metoxyl]-phenoxyphosphorylamino}-propionic (từ ví dụ 2, US2010/0298257)

Từ đồng nghĩa: hỗn hợp chất đồng phân không đối quang 5'-O-(isopropyl-L-alanat, phenyl phosphoramidyl)-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-uridin.

Bình 3 cổ loại 5 L được trang bị bộ phận khuấy cơ học, bể nước muối trong đá, nhiệt kế trong, và môi trường khí nitơ. Bình được nạp L-alanin isopropyl este hydroclorua (82,0 g, 0,490 mol) và diclometan khan (0,80 L). Trong khi bình được khuấy, phenyl diclophosphat (85,0 g, 0,40 mol) được bổ sung trong một lô và khuấy. Trong khi vẫn duy trì nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ -5 đến 5°C, dung dịch của N-metylimidazol (NMI, 250 g, 3,07 mol) trong diclometan (250 mL) được bổ sung trong thời gian nửa giờ. Dung dịch được khuấy trong 1 giờ trong khoảng nhiệt độ này. 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-uridin (3,80,0 g, 0,307 mol) được bổ sung ở nhiệt độ 0°C trong một phần và sau đó bình phản ứng được để ấm lên từ từ trong bể nước muối. Khi được 1 giờ, nhiệt độ bên trong tăng lên đến -2°C. TLC (5% metanol trong HCL) ở thời điểm 1 giờ cho thấy hơn 50% nucleosit được tiêu thụ. Bể được lấy ra và bình phản ứng đạt đến nhiệt độ môi trường trong 1 giờ nữa. TLC sau 3 giờ và ở thời điểm 5 giờ tổng cộng cho thấy 95% nucleosit ban đầu được tiêu thụ. Phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung metanol (100 mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 5 phút.

Hỗn hợp phản ứng được rửa bằng HCl 1N (2x500 mL), sau đó bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa (2x500 mL). Lớp hữu cơ tách riêng được làm khô qua natri sulfat khan (50 g) và được lọc. Dung dịch được làm bay hơi dưới áp suất giảm và sau đó là trong chân không cao tới khô để thu được sản phẩm thô dưới dạng dầu nhớt (170 g). NMR của sản phẩm thô (^{31}P và ^1H) được thực hiện. ^{31}P -NMR cho thấy khoảng 1% của tổng lượng phospho kết hợp là do sự có mặt của chất đồng phân 3' của hợp chất 5.

Bổ sung pyridin khan (1700 mL) vào sản phẩm thô. Dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm và sau đó là trong chân không cao để làm giảm hàm lượng nước của hỗn hợp thô bằng cách làm bay hơi đồng thời. Dầu thu được được tái hòa tan trong pyridin khan (500 mL) và sau đó được bổ sung t-butyldimetylsilyl clorua dư (9,0 g, 60 mM). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ môi trường. Tiến trình phản ứng được theo dõi bằng UPLC/MS. Sau 3 giờ, tạp chất 3' của hợp chất 5 không còn được phát hiện và phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung metanol (50 mL).

Phản ứng được làm bay hơi dưới áp suất giảm thành dầu. Phần còn lại được hòa tan trong etyl axetat (1,5 L) và rửa bằng HCl 1N (2x500 mL), sau đó bằng dung dịch

natri bicacbonat bão hòa (2x500 mL). Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat khan (50 g), lọc và làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô dưới dạng dầu màu vàng nhạt.

Dầu thô được pha loãng bằng cùng thể tích của diclometan và được nạp lên ống silicagel 2,5 Kg và môđun nén hướng tâm ở áp suất không khí 100 psi (1 psi = 6,895 kPa). Bằng cách sử dụng bơm gradien ở 60 psi và tốc độ chảy 400 mL/phút, ống được rửa bằng metylen clorua (4L), sau đó là gradien 1-4% metanol trong metylen clorua (48 L). Hầu hết tạp chất chính (sản phẩm cộng di-(isopropylalanyl) phenyl phosphat, 3',5'-bis phosphoramidat, 3'-phosphoramidat-5'-TBDMS (7)) được rửa giải bằng gradien khoảng 3%. Sản phẩm mong muốn được rửa giải bằng metanol từ 3 đến 4%. Sản phẩm chứa phân đoạn được phân loại thành hai phần. Phần thứ nhất chứa lượng nhỏ của tạp chất bên trên và phần còn lại là sản phẩm tinh khiết. Tập hợp thứ nhất của các phân đoạn chứa lượng nhỏ của tạp chất ít phân cực hơn (tạp chất bên trên) như 3',5'-bis phosphoramidat và di-alanylphenyl phosphat và phần lớn là chất đồng phân không đối quang *Rp* cần được tinh chế bằng cột thứ hai (Thuật ngữ liên quan, bên trên và bên dưới dùng để chỉ sự rửa giải trên sắc ký trên silicagel pha thường, trong đó "chất đồng phân bên trên" nghĩa là chất đồng phân rửa giải thứ nhất). Tập hợp thứ hai của các phân đoạn không chứa lượng đáng kể của tạp chất - chỉ là *Rp* còn lại và hầu hết là chất đồng phân không đối quang *Sp*. Sau đó, nó được tái kết hợp với phân đoạn được rửa giải qua cột hai lần. Dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm và bột màu trắng thu được được tiếp tục làm khô (0,20 mmHg) trong 1 giờ để thu được 42 g phần không tinh khiết (4:1 chất đồng phân bên trên so với bên dưới dựa trên ³¹P-NMR) và 38 g phần tinh khiết (1:3 chất đồng phân bên trên so với bên dưới). Phần không tinh khiết được rửa giải lại qua cột theo cách tương tự để thu được 3,8 g chất đồng phân bên trên tinh khiết 97% (phân đoạn dự trữ) và 36 g sản phẩm tinh khiết với tỷ lệ 4:1. Hai phần chính được hòa tan trong HCL, được kết hợp, được làm bay hơi dưới áp suất giảm và làm khô (50°C, 0,2 mmHg, 24 giờ) để thu được 74 g (45,7%) sản phẩm tinh khiết (hợp chất 9) với tỷ lệ chất đồng phân không đối quang là 48:51, dưới dạng bột màu trắng, mp bằng khoảng 75-85°C.

Để tạo ra chất rắn vô định hình của hỗn hợp chất đồng phân không đối quang, 74 g bột màu trắng được khuấy với t-butyl metyl ete (750 mL), tạo ra dung dịch một phần và phần gôm rắn còn lại. Trong khi khuấy, heptan (750 mL) được bổ sung từ từ

và huyền phù được khuấy cơ học trong thời gian 1 giờ cho đến khi hầu hết gồm được chuyển hóa thành chất rắn màu trắng. Chất rắn được cạo bằng dao bay và huyền phù đặc thu được được lọc. Chất rắn được rửa bằng heptan (4x50 mL) và làm khô trong chân không (50°C, 0,2 mmHg, 24 giờ) để thu được bột vô định hình màu trắng (64 g) với khoảng nhiệt độ nóng chảy rộng vào khoảng 70-80°C. ^1H và ^{31}P NMR phù hợp với cấu trúc và HPLC cho thấy độ tinh khiết là 99,8% với tỷ lệ chất đồng phân không đối quang là 46:54 (cũng được xác nhận bằng ^{31}P NMR).

Phương pháp khác để tạo ra hỗn hợp rắn của hợp chất 9. Sau khi sắc ký, phần còn lại được làm bay hơi đồng thời với diclometan hai lần (5 mL/g) và làm khô trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 35-40°C ở áp suất 35-45 mTorr (1 mTorr = 0,0001333 kPa). Phần bột còn lại được sàng qua sàng lọc 250 micron và tiếp tục được làm khô trong cùng điều kiện cho đến khi lượng diclometan dư dưới 400 ppm như được xác định bằng sắc ký khí (GC) có bộ phận hóa hơi. Bột mịn vô định hình có màu từ trắng nhờ đến trắng thu được có nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh nằm trong khoảng từ 53,7 đến 63,5°C.

Xác định đặc điểm của hợp chất 9 (hỗn hợp của các chất đồng phân):

^1H -NMR (CDCl_3) 010,05 (brs, 1H, NH, *Sp*), 10,00 (brs, 1H, NH, *Rp*), 7,49 (d, 1H, C6-H, *Sp*), 7,36 (m, 5H, C6-H, *Rp*, thơm), 7,23-7,14 (m, 6H, *Rp/Sp*, thơm), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, *Rp/Sp*), 5,63 (d, 1H, C5-H, *Sp*), 5,58 (d, 1H, C5-H, *Rp*), 5,01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂ *Rp/Sp*), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, *Rp/Sp*), 4,12 (m, 2H, ala-CHCH₃, *Rp/Sp*), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, *Rp/Sp*), 1,391,22 (m, 12H, tất cả các CH₃, *Rp/Sp*).

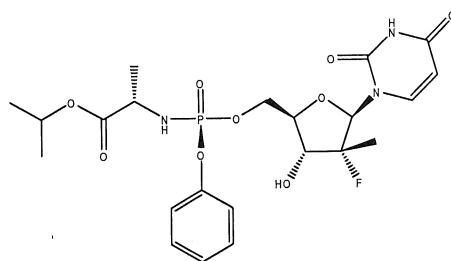
^{31}P -NMR (CDCl_3) 03,60 (*Rp*), 3,20 *Sp* so với triphenylphosphat ở -17,80 ppm. ES-MS M+1 530,2. Phân tích nguyên tố: % theo tính toán (bao gồm 0,29% nước như phát hiện được bằng phân tích Karl Fisher) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84. % thực nghiệm: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Điều chế 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (từ ví dụ 1, US2010/0298257)

Bổ sung 3', 5'-O-dibenozyl-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-N⁴-benzoylxytidin (500 g, 0,874 mol) và 70% axit axetic trong nước (7,5 L) vào bình loại 10 L. Gia nhiệt dung dịch đến hồi lưu (110°C) trong thời gian 20 giờ. TLC cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn (*R_f* 0,6 trong 5% metanol trong diclometan (HCL)). Hỗn hợp được làm nguội

xuống nhiệt độ môi trường và pha loãng bằng nước (2 L). Sau khi khuấy trong 2 giờ, chất kết tủa thu được được thu gom bằng cách lọc và chất rắn được rửa bằng nước (5 L) và làm khô trong khí quyển ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 12 giờ để thu được 360 g (88%). Hợp chất trung gian dibenzoyluridin này được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo bằng cách bổ sung toàn bộ vào dung dịch amoniac trong metanol mới được điều chế hoàn toàn (5,4 L, khoảng 25%) ở nhiệt độ 0°C. Nhiệt độ này được duy trì trong thời gian 3 giờ và sau đó để ấm lên tới 15°C trong thời gian 24 giờ. TLC cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn (R_f 0,4 trong 10% metanol trong HCL). Hỗn hợp phản ứng được lọc qua tầng Xelit và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô (216 g). Sản phẩm thô được khuấy với etyl axetat (325 mL) trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ môi trường. Chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc và rửa bằng etyl axetat (216 mL). Chất rắn được làm khô trong chân không ở nhiệt độ môi trường trong 4 giờ để thu được 160 g (78%) sản phẩm mong muốn với độ tinh khiết HPLC là 98,7%. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) 011,44 (br s, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'H), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C-5'-Ha, C-3'H. C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH₃). ES-MS M-I 259.

Ví dụ 10: Điều chế hợp chất 10 (từ US2010/0298257)



10

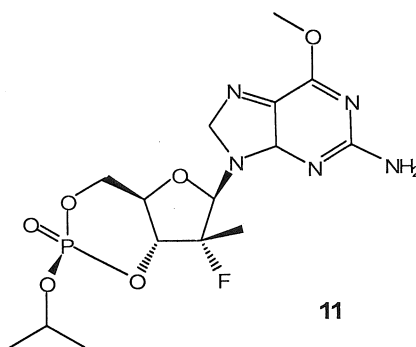
Kết tủa trực tiếp hợp chất 10 (từ US2010/0298257; ví dụ 4): Bổ sung phenydiclophosphat (7,5 mL, 50 mmol) vào dung dịch có khuấy của L-alanin isopropyl este hydroclorua (10,5 g, 61,5 mmol, được làm khô đồng sôi, hai lần, với 50 mL toluen mỗi lần) trong diclometan (100 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được làm lạnh xuống -10°C và sau đó được bổ sung dung dịch của N-metylimidazol (30,5 mL, 384,3 mmol) trong 30 mL diclometan trong thời gian 30 phút. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10 đến -15°C trong 1 giờ. Bổ sung 2'-deoxy-2'-flo-2'- C-metyluridin (10 g, 38,4 mmol) (xem US2010/0298257, ví dụ 1) vào hỗn hợp trên đây trong một lô và khuấy hỗn hợp dưới -10°C trong thời gian 3 giờ và sau đó để ấm lên từ từ đến 20°C (6 giờ). Khuấy hỗn hợp

ở nhiệt độ này qua đêm (15 giờ) và sau đó làm dừng bằng 10 mL metanol. Dung môi được làm bay hơi và phần còn lại được tái hòa tan trong EtOAc (200 mL). Lớp EtOAc được rửa bằng nước (100 mL), HCl 1N (3x75 mL), dung dịch nước NaHCO₃ 2% (50 mL) và nước muối (50 mL). Làm khô lớp hữu cơ trên Na₂SO₄, lọc và cô. Phần còn lại được làm khô trong chân không cao trong 2 giờ để thu được bột màu trắng (22 g).

Bột trên đây được hòa tan trong 33 mL HCl và sau đó được bổ sung 65 mL isopropyl ete để thu được dung dịch bão hòa. Dung dịch này được lọc qua miếng Xelit nhỏ và phần dịch lọc được khuấy với các tinh thể mầm của hợp chất 10 trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ môi trường (khoảng 22°C - lưu ý rằng việc làm lạnh huyền phù đến 0°C sẽ làm cho sản phẩm thô bị phủ dầu bên ngoài). Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng isopropyl ete (20 mL) và làm khô để thu được 4,58 g (hỗn hợp khoảng 85:15 của hợp chất 10: chất đồng phân R tại P một cách tương ứng như được xác định bằng ³¹P NMR) bột màu trắng. Chất rắn trên đây được tạo huyền phù trong 23 mL HCL và sau đó được cho hồi lưu trong thời gian 3 giờ. Hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 15 giờ. Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng 4,5 mL HCl lạnh và làm khô trong chân không cao ở nhiệt độ 45°C để thu được hợp chất 10 tinh khiết, mp 93,9-104,7°C, độ tinh khiết HPLC 99,74% (3,11 g, 15,2% từ uridin nucleosit).

Hợp chất 10: ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8,63 (br s, ¹H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, o-thơm), 7,26-7,18 (m, 3H, m,p-thơm), 6,18 (br d, 1H, Cl'-H), 5,70 (d, 1H, C5-H), 5,02 (sept, CH-(CH₃)₂), 4,53 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3,77 (br s, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'-CH₃), 1,37 (d, 3H, ala-CH₃) 1,24 (d, 6H, CH-(CH₃)₂).

Ví dụ 11: Điều chế hợp chất 11 (từ US 2010/0081628)



Tổng hợp 6-etoxy-9-((4aR,6R,7R,7aR)-7-flo-2-isopropoxy-7-metyl-2-oxo-tetrahydro-2,5-furo[3,2-d][1,3,2]dioxaphosphinin-6-yl)-9H-purin-2-yl-amin (hợp chất 11) (hợp chất 19, US 2010/0081628)

(2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-etoxy-purin-9-yl)-4-flo-2-hydroxymetyl-4-metyl-tetrahydro-furan-3-ol (150 mg, 0,46 mmol) được hòa tan trong pyridin khan (2 mL) ở nhiệt độ 0°C. Dung dịch của 1H-tetrazol 0,45M trong axetonitril (2,55 mL) được bổ sung, sau đó là bis (N,N-diisopropylamino) isopropylphosphoramidit (0,16 mL, 0,55 mmol, 1,2 đương lượng). Hỗn hợp được để ấm lên từ từ đến nhiệt độ môi trường trong thời gian 3 giờ. TLC cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn. Làm dừng phản ứng bằng cách bổ sung nước (0,1 mL). Dung dịch phản ứng được cô dưới áp suất giảm và sau đó phần còn lại được nghiền với etyl axetat (5 mL). Chất kết tủa màu trắng thu được được loại bỏ bằng cách lọc và cô phần dịch lọc dưới áp suất giảm.

Sản phẩm trung gian thu được là hợp chất phosphit vòng được hòa tan trong axetonitril (2 mL) và sau đó được xử lý bằng t-butyl hydroperoxit (70% trong nước, 0,19 mL) trong thời gian 5 giờ ở nhiệt độ môi trường. TLC cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn. Dung dịch phản ứng được cô dưới áp suất giảm và phần còn lại được tinh chế bằng cột sắc ký (Analogix sử dụng gradien từ 0 đến 5% IPA trong HCL). Hai chất đồng phân không đối quang (hợp chất 11 và chất đồng phân R tại P) có thể phân tách được. Phân đoạn chứa mỗi chất đồng phân không đối quang được kết hợp theo cách riêng rẽ và cô dưới áp suất giảm đến chất rắn màu trắng để thu được 20 mg mỗi chất đồng phân không đối quang (hiệu suất kết hợp là 20%).

Hợp chất 11

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO): δ -6,49;

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8,17 (s, 1H), 6,47 (bs, 2H), 6,27 (d, J=21,2 Hz, 1H), 4,73-4,62 (m, 4H), 4,45 (q, J=7,0 Hz, 2H), 4,27-4,21 (m, 1H), 1,39-1,34 (m, 9H), 1,20 (d, J=22,8 Hz, 3H).

MS (ESI): m/z 432,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

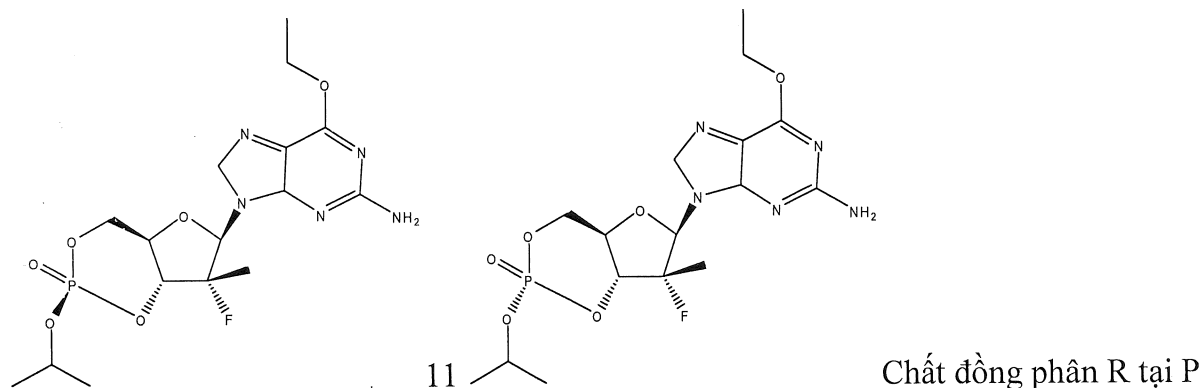
Chất đồng phân R tại P

^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO): δ = -4,68;

^1H -NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8,15 (s, 1H), 6,63 (s, 2H), 6,27 (d, J =21,2 Hz, 1H), 4,74-4,58 (m, 4H), 4,45 (q, J =6,4 Hz, 2H), 4,42-4,37 (m, 1H), 1,36 (t, J =7,2 Hz, 3H), 1,32 (d, J =3,6 Hz, 3H), 1,30 (d, J =3,6 Hz, 3H), 1,22 (d, J =22,8 Hz, 3H).

MS (ESI): m/z 432,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Cấu trúc của hợp chất 11 và chất đồng phân R tại P được thể hiện dưới đây.



Tổng hợp (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-ethoxy-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-4-methyltetrahydro-furan-3-ol (hợp chất 16, US 2010/0081628)

Bình đáy tròn khô loại 500 mL được nạp (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-ethoxy-9H-purin-9-yl)-2-(benzoyloxymethyl)-4-fluoro-4-methyltetrahydrofuran-3-yl benzoat (11 g, 20,92 mmol). Etanol tuyệt đối khan (210 mL) được bổ sung và sau đó là K_2CO_3 khan (28,91 g, 209,2 mmol). Huyền phù được khuấy và gia nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong môi trường nitơ trong thời gian 5,5 giờ. Toàn bộ nguyên liệu ban đầu được tiêu thụ trong khoảng thời gian đó theo thử nghiệm TLC. Hỗn hợp được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và chất rắn được lọc ra. Phần dịch lọc được trung hòa bằng cách thêm axit axetic băng (2,52 g) tới độ pH khoảng 7 và cô dưới áp suất giảm. Phần còn lại được hòa tan trong metanol và được trộn với silicagel (15 g). Hỗn hợp được làm khô của sản phẩm thô và silicagel được chuyển sang ống rỗng và tách riêng qua cột sắc ký (Analogix 220 g, gradien từ 0 đến 15% MeOH trong DCM) để thu được sản phẩm (5% MeOH trong DCM) dưới dạng chất rắn bột màu trắng (3,73 g, 54,5%). Chất rắn màu trắng thứ hai được tách từ cột (10% MeOH trong DCM, 1,44 g) và nó là hỗn hợp của hai dime của nucleosit. Chất rắn màu trắng thứ ba, phân cực hơn, được thu gom từ cột (15% MeOH trong DCM, 0,47 g) và nó là hỗn hợp của các trime của nucleosit. Độ tinh khiết HPLC của sản phẩm là 99,94%.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 8,16 (s, 1H, 8-H), 6,55 (s, 2H, NH₂), 6,04 (d, 1H, C1'-H), 5,66 (d, 1H, 3'-OH), 5,24 (m, 1H, 5'-OH), 4,44 (q, 2H, 6-OCH₂), 4,23-4,08 (m, 1H, C3'-H), 3,91-3,82 (m, 2H, C4'-H và C5'-H_a), 3,71-3,66 (m, 1H, C5'-H_b), 1,36 (t, 3H, CH₃ của etyl), 1,06 (d, 3H, C2'-CH₃).

Tổng hợp (2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-clo-9H-purin-9-yl)-2-(benzoyloxymetyl)-4-flo-4-metyltetrahydrofuran-3-yl benzoat (hợp chất 12, US 2010/0081628)

Bình đáy tròn ba cổ loại 12 L được nạp 6-clo-2-aminopurin (225,4 g, 1,329 mol). Tert-BuOH khan (4,5 L) được bổ sung và dung dịch được khuấy bằng bộ phận khuấy cơ học ở nhiệt độ môi trường. Kali tert-butoxit (rắn, 151,6 g, 1,35 mol) được bổ sung từng phần dưới dòng khí nitơ trong khi khuấy. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút nữa. Bình đáy tròn loại 5 L được nạp α-bromua (10, 197 g, 0,451 mol) và 3 L axetonitril khan ở nhiệt độ môi trường. Dung dịch bromua được bổ sung vào huyền phù bazơ purin trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ môi trường. Bình loại 5 L được rửa bằng axetonitril (2x1 L) để chuyển bromua hoàn toàn vào hỗn hợp phản ứng. Gia nhiệt hỗn hợp từ từ lên 50°C trong thời gian 2 giờ bằng vỏ gia nhiệt và bộ điều chỉnh, và khuấy trong thời gian 20 giờ. Phản ứng gần như hoàn toàn như được thể hiện bằng TLC beta (R_f 0,28, 30% EtOAc trong hexan). Hỗn hợp phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung NH₄Cl bão hoà (200 mL) để tạo ra huyền phù. Chất rắn đã được tạo huyền phù được loại bỏ bằng cách lọc qua miếng Xelit 3 cm trong phễu Buchner dung tích 2,5 L bằng sứ. Chất rắn được rửa bằng toluen (3x100 mL). Phần dịch lọc kết hợp được trung hòa bằng cách bổ sung dung dịch HCl 6N cho đến khi độ pH là 7 (khoảng 220 mL). Hỗn hợp được cô dưới áp suất giảm. Khi thể tích của hỗn hợp giảm xuống đến khoảng một phần ba thể tích, chất rắn kết tủa thêm được loại bỏ bằng cách lọc theo cách tương tự. Phần dịch lọc được cô tiếp đến thể tích khoảng 800 mL. Phần còn lại được nạp lên cột có nắp (1,6 kg silicagel loại nhanh trong phễu Buchner dung tích 6 L bằng thủy tinh mờ) và được rửa giải (bằng cách hút) với gradien 10% etyl axetat trong hexan (6 L) để loại bỏ tạp chất không phân cực, 30% etyl axetat trong hexan để thu được lượng nhỏ của lactol (6 L), và sau đó là 40%-45% etyl axetat trong hexan (4 L) để rửa giải lượng chính của sản phẩm. Sản phẩm chứa phân đoạn được kết hợp, được cô dưới áp suất giảm và làm khô trong chân không (0,2 mmHg, 24 giờ, nhiệt độ môi trường) tạo thành chất rắn bột màu trắng (150,7 g,

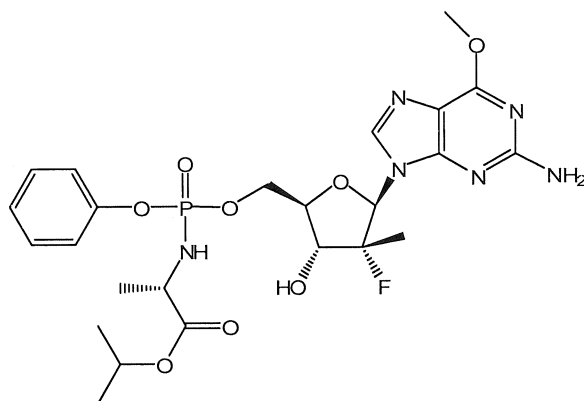
$\beta/\alpha=14:1$ bằng NMR. $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3) β : $\delta=1,33$ (d, 22,4 Hz, 2'-C- CH_3), α : 1,55 (d, 22 Hz, 2'-C— CH_3).

Bột hỗn hợp sản phẩm được hòa tan trong metanol (700 mL) ở nhiệt độ môi trường. Khi để yên, chất rắn từ từ được tạo thành trong thời gian 2 giờ. Huyền phù được làm lạnh trong tủ lạnh đến -5°C trong thời gian 17 giờ. Chất rắn màu trắng thu được được thu gom bằng cách lọc và rửa bằng MeOH lạnh (-5°C 3x60 mL) và etyl ete (3x100 mL). Chất rắn được làm khô trong chân không (0,2 mmHg, 24 giờ, nhiệt độ môi trường) để thu được 110,5 g sản phẩm β với tỷ lệ rất tốt (β/α 99,8:1 theo HPLC). Phần dịch lọc được cô một phần (khoảng 400 mL) và sau đó pha loãng bằng nhiều MeOH hơn (400 mL) trong khi gia nhiệt đến 60°C . Dung dịch được làm nguội xuống nhiệt độ môi trường, được tạo mầm tinh thể và làm lạnh xuống -5°C . Sản lượng thứ hai được thu gom, rửa và làm khô theo cách tương tự để thu được nhiều sản phẩm hơn dưới dạng chất rắn màu trắng (12,26 g) với độ tinh khiết chất đồng phân không đối quang tương tự. Nước cái được cô tới khô dưới áp suất giảm (khoảng 25 g). Phần còn lại là hỗn hợp của các chất đồng phân β và α . Nó được tải lên cột sắc ký silicagel tự động (Analogix, ống 240 g, 40% đến 50% etyl axetat trong hexan) để thu được 14,52 g bột sản phẩm mà được tái kết tinh từ MeOH, rửa và làm khô theo cách tương tự để thu được 8,46 g sản phẩm nữa có độ tinh khiết cao.

Ba chất rắn này được đánh giá là có độ tinh khiết tương tự và chúng được kết hợp để thu được 131,2 g sản phẩm kết tinh màu trắng, (55% từ đường brom, 49% từ lactol). Mp $160,5\text{--}162,0^\circ\text{C}$, độ tinh khiết HPLC 99,5% bao gồm 0,20% α .

$^1\text{H-NMR}$ (β -anome tinh khiết, CDCl_3): $\delta=8,03$ (m, 2H, thơm), 7,93 (m, 2H, thơm), 7,88 (s, 1H, C8-H), 7,60 (m, 1H, thơm), 7,50 (m, 1H, thơm), 7,44 (m, 2H, thơm), 7,33 (m, 2H, thơm), 6,44 (dd, 1H, C1'-H), 6,12 (d, 1H, C3'-H), 5,35 (s, 2H, NH_2), 5,00 (dd, 1H, C5'-Ha), 4,76 (m, 1H, C4'-H), 4,59 (dd, 1H, C5'-Hb), 1,33 (d, 3H, CH_3).

Ví dụ 12: Điều chế hợp chất 12 (từ US20110015146)



12

Tổng hợp (2S)-isopropyl 2-((((2R,3R,4R,5R)-5(2-amino-6-methoxy-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphorylamino)propanoat

Bình đáy tròn khô loại 250 mL được nạp phenyl diclophosphat (2,66 g, 12,61 mmol) và diclometan khan (40 mL). Muối amino este (2,60 g, 15,53 mmol) được bổ sung vào dung dịch và hỗn hợp được làm lạnh xuống -5°C . N-metyl imidazol (7,7 mL, 97 mmol), sau đó được bổ sung nhanh qua xi lanh khô ở nhiệt độ -5°C và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ -5°C trong 1 giờ. Nucleosit ((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-methoxy-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymetyl)-4-metyltetrahydrofuran-3-ol), 3,04 g, 9,7 mmol) được bổ sung trong một phần từ lọ nhỏ ở nhiệt độ -5°C , và chất rắn từ từ được hòa tan trong 20 phút. Nhiệt độ phản ứng được để tăng lên đến nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 giờ. Sau 17 giờ, phản ứng là không hoàn toàn. Các chất phản ứng được tạo ra thêm (từ phosphat (2,66 g), aminoeste (2,60 g), và N-metyl imidazol (3,8 mL, 48 mmol)) và được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -5°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ nữa. Phản ứng gần như hoàn toàn như được thể hiện bởi kết quả TLC và được pha loãng bằng 70 mL diclometan. Dung dịch HCl (1N, 70 mL) được bổ sung. Lớp nước được tách ra và chiết bằng diclometan. Rửa lớp hữu cơ bằng NaHCO_3 bão hòa, nước, nước muối và làm khô qua MgSO_4 . Sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, phần dĩnh còn lại được tinh chế qua cột sắc ký tự động sử dụng ống 240 g và gradien 0-8% 2-PrOH trong diclometan để thu được sản phẩm dưới dạng bột rắn (4,16 g, 7,14 mmol, hiệu suất là 73%). Độ tinh khiết HPLC là 97,4%. Phổ NMR của sản phẩm cho thấy nó là hỗn hợp của hai chất đồng phân không đối quang với tỷ lệ 1,2:1.

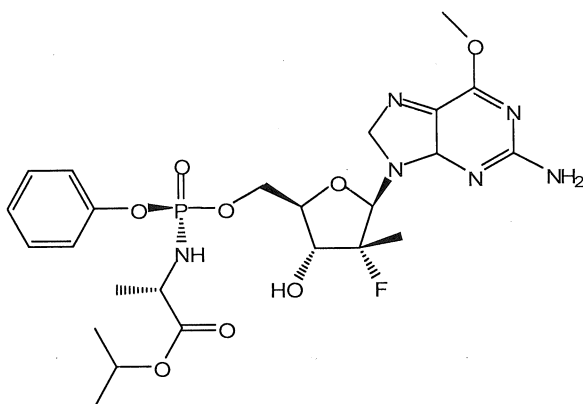
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta=7,98$ (1H, s, 8-H của một chất đồng phân), 7,95 (1H, s, 8-H của chất đồng phân kia), 7,37-7,32 (2H, m, H thơm), 7,22-7,15 (3H, m, H

thơm), 6,6 (2H, s, NH₂), 6,11 (1H, d, Cl'-H của một chất đồng phân), 6,09 (1H, d, Cl'-H của chất đồng phân kia), 6,09-5,98 (1H, m, amit NH), 5,88 (1H, d, 3'-OH của một chất đồng phân), 5,81 (1H, d, 3'-H của chất đồng phân kia), 4,85-4,75 (1H, hepta, metin H của iso-propyl), 4,46-4,27 (2H, m, C4'-H, α-H của amino este), 4,15-4,07 (1H, m, C3'-H), 3,96 (3H, s, OCH₃), 3,82-3,72 (2H, m, C5'-H_a và C5'-H_b), 1,23-1,06 (9H, m, CH₃'s của amino este), 1,03 (3H, d, C2'-CH₃).

³¹P-NMR (DMSO-d₆): 0=4,91 (một chất đồng phân), 4,72 (chất đồng phân kia).

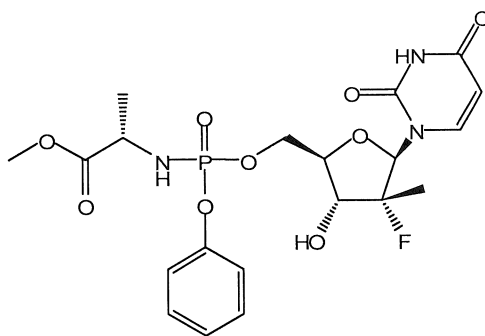
Phương pháp tinh chế khác là thay đổi về mặt hoá học sản phẩm phụ thứ yếu 3' phosphoramidat để làm đơn giản việc tách bằng sắc ký. Sản phẩm phosphoramidat thô được hòa tan trong pyridin khan (5 mL/g), và được xử lý bằng 0,5 đương lượng mol của t-butyldimetylsilyl clorua ở nhiệt độ môi trường để phản ứng một cách có chọn lọc với hydroxyl bậc nhất ở vị trí 5' tự do của tạp chất chất đồng phân 3'. Tiến trình phản ứng có thể được theo dõi bằng LC/MS. Ngay khi chất đồng phân 3' được chuyển hóa thành dẫn xuất 5'-tBDMS-3'-phosphoramidat, làm dừng phản ứng bằng metanol (3 đương lượng), cô dưới áp suất giảm, phân bố giữa etyl axetat và 5% axit xitric và sau đó lớp hữu cơ được cô. Sau đó, phần còn lại được cho tiến hành chạy sắc ký mà có thể được thực hiện với gradien nhanh hơn và lượng tải cao hơn và đạt được độ tinh khiết cao hơn.

Ví dụ 13: Điều chế hợp chất 13 (từ US20110015146)



13

Ví dụ 14: Điều chế hợp chất 14 (từ US 7,964,580, ví dụ 5)

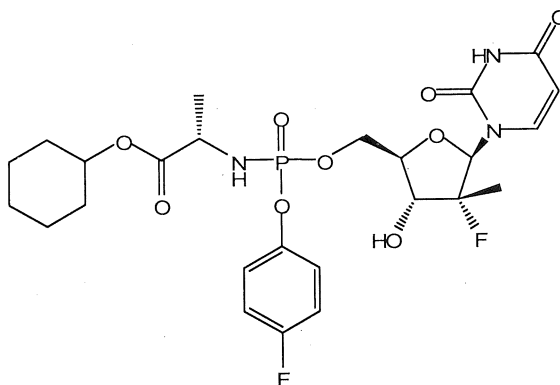


14

Điều chế 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin-5'-phenyl metoxy-alanyl phosphat)

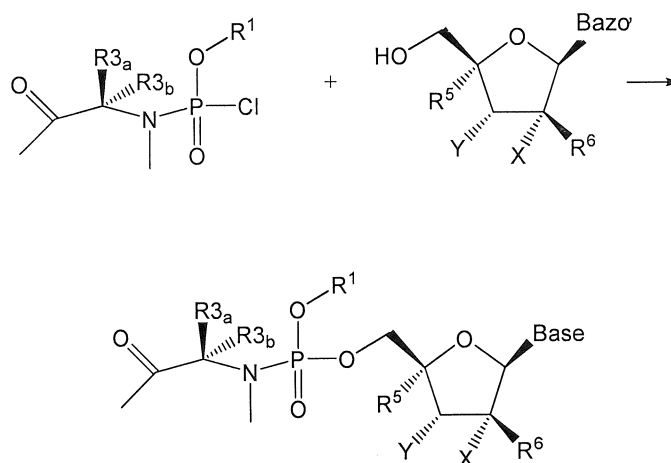
Phenyl metoxyalaninyl phosphorocloridat (1 g, 6,5 đương lượng) được hòa tan trong 3 mL THF được bổ sung vào hỗn hợp của 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (0,15 g, 1 đương lượng) và N-metylimidazol (0,3 g, 8 đương lượng) trong 3 mL THF có khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng, sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Loại bỏ dung môi bằng áp suất giảm. Sản phẩm thô thu được được hòa tan trong metanol, được tinh chế bằng HPLC điều chế (prep-HPLC) trên cột YMC 25x30x2 mm bằng cách sử dụng pha động rửa giải gradien nước/axetonitril. Axetonitril và nước được loại bỏ dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm mong muốn (50,1 mg, 15,6%). ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 1,20-1,27 (m, 6H), 3,58 (d, $J=16,0$ Hz, 3H), 3,75-3,92 (m, 2H), 4,015-4,379 (m, 2H), 5,54 (t, $J=10,2$ Hz, 1H), 5,83-5,91 (m, 1H), 6,00-6,16 (m, 1H), 7,18 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,35 (t, $J=4,4$ Hz, 2H), 7,55 (s, 1H), 11,52 (s, 1H); MS, m/e 502 ($M+1$) $^+$.

Ví dụ 15: Điều chế hợp chất 15 (ví dụ 55, từ US 7,964,580)



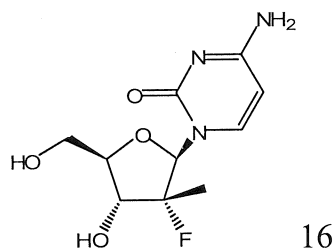
15

^1H NMR (DMSO-d_6) δ > 1,20-1,44 (m, 12H), 1,60-1,71 (m, 4H), 3,75-4,02 (m, 2H), 3,94-4,02 (m, 1H), 4,19-4,26 (m, 2H), 4,59-4,61 (m, 1H), 5,57 (t, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,85-6,06 (m, 3H), 7,17-7,23 (m, 4H), 7,54 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 11,50 (s, 1H); MS, m/e 587,92 ($M + 1$) $^+$



Quy trình chung để điều chế dẫn xuất nucleosit phosphoramidat được mô tả ở cột 461 của US 7,964,580. Dung dịch của phosphorocloridat thích hợp (6,5 đương lượng) trong tetrahydrofuran khan (THF) có thể được bổ sung vào hỗn hợp của nucleosit (1 đương lượng) và N-metylimidazol (8 đương lượng) trong THF khan có khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng với hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm. Dung môi có thể được loại bỏ trong chân không và sản phẩm thô được tinh chế bằng cột sắc ký và/hoặc sắc ký lớp mỏng điều chế để thu được hợp chất mong muốn.

Ví dụ 16: Điều chế hợp chất 16 (từ US 7,429,572)



Tổng hợp (2'R)-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metylxytidin bắt đầu từ xytidin

Bước 1: Bổ sung anhydrit benzoic (102,4 g, 0,452mol) vào huyền phù chứa xytidin (100 g, 0,411 mol) trong DMF (2,06 L). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 giờ. DMF được loại bỏ trong chân không và phần còn lại được nghiền với dietyl ete. Chất rắn thu được được thu gom bằng cách lọc hút và rửa bằng dietyl ete (2x200 mL). Tiếp tục làm khô trong chân không ở nhiệt độ trong phòng, tạo ra N⁴ benzamit (140,6 g, 98,3%). Một phần của nguyên liệu này (139,3 g, 0,401 mol) được hòa tan trong pyridin khan (1,2 L) và được xử lý bằng 1,3-diclo-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan (141,4 mL, 0,441 mol) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp được cô đến gần khô trong

chân không và được làm bay hơi đồng thời với toluen (3x200 mL). Phần còn lại được xử lý bằng EtOAc (1,8 L) và rửa bằng HCl (2x200 mL, 0,05N), NaHCO₃ (5%, 2x400 mL). Lớp hữu cơ được rửa, làm khô (Na₂SO₄), lọc, và làm bay hơi cho đến khi khô. Hợp chất 16-1 (hợp chất 4-1 từ US 7,429,572) (256,5 g, >100%) được tách dưới dạng bột màu trắng và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2: Hợp chất 16-1 (236,5 g, 0,40 mol) được hòa tan trong THF khô (1,22 L). DMSO khan (180,8 mL, 2,1 mol) được bổ sung và dung dịch thu được được làm nguội xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -15°C. Anhydrit trifloaxetic (90,6 mL, 0,64 mol) được bổ sung từng giọt trong thời gian 45 phút và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -20°C đến -15°C trong thời gian 2 giờ, sau đó triethylamin khan (223,5 mL, 1,6 mol) được bổ sung trong thời gian 20 phút. Hỗn hợp phản ứng thô chứa keton 16-2 được hòa tan trong EtOAc (500 mL), và dung dịch thu được được rửa bằng H₂O (3x400 mL), làm khô (Na₂SO₄) và dung môi được loại trong chân không để thu được chất rắn màu vàng mà được tinh chế trên cột silicagel, rửa giải bằng gradien từng bước của Et₂O (0-60%) trong hexan, sau đó là gradien từng bước của EtOAc (50-100%) trong hexan. Keton thô thu được theo cách này (khoảng 192 g) được kết tinh từ ete dầu mỏ để thu được keton 16-2 (hợp chất 4-2 từ US 7,429,572) (138,91 g, 57,5% từ xytidin) dưới dạng chất rắn màu trắng và 22 g nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng, 16-1, dưới dạng chất rắn màu vàng.

Bước 3: Hợp chất 16-2 (48,57 g, 8,26 mmol) được hòa tan trong toluen khan (khoảng 400 mL) và loại bỏ dung môi trong chân không cùng với việc loại bỏ hơi ẩm. Sau đó, phần còn lại được tiếp tục làm khô trong chân không (bơm dầu) trong 2 giờ nữa. Với việc loại bỏ triệt để hơi ẩm, bột dư được hòa tan trong diethyl ete khan (1,03 L) trong môi trường argon. Dung dịch thu được được làm lạnh xuống -78°C trong môi trường argon và MeLi (1,6 M, 258,0 mL, 0,413 mol) được bổ sung từng giọt qua phễu bổ sung. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy hỗn hợp trong 2 giờ ở nhiệt độ -78°C. Dung dịch nước NH₄Cl 1M (500 mL) được bổ sung từ từ. Sau khi ấm lên đến nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp được rửa bằng H₂O (2x500 mL), làm khô (Na₂SO₄), và sau đó được cô tới khô để thu được bột màu nâu (khoảng 60 g, >100%).

Phản ứng được tiến hành hai lần nữa bằng cách sử dụng 37,62 g và 56,4 g hợp chất 16-2. Sản phẩm thô kết hợp (128,0 g, 0,212 mol) được hòa tan trong THF (1,28 L) và được xử lý bằng HOAc đặc (23 mL, 0,402 mol). Bổ sung TBAF (384,0 mL, 1M

trong THF) vào dung dịch. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 0,75 giờ và hỗn hợp được xử lý bằng silicagel (750 g) và cô tới khô. Bột được tải lên trên cột silicagel được đóng gói trong CH_2Cl_2 . Rửa giải bằng 1:7 EtOH- CH_2Cl_2 , tạo ra chất sáp rắn tối màu mà được hấp phụ trước trên silicagel (300 g) và được tiến hành sắc ký như được mô tả trên đây. Hợp chất 16-3 (hợp chất 4-3 từ US 7,429,572) (46,4 g, 53,0% từ 16-2) được tách dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,20 (s, 3H, CH_3), 3,62-3,69 (m, 2H,), 3,73-3,78 (m, 2H,), 5,19 (t, 1H, $J=5,4$ Hz, OH-5'), 5,25 (s, 1H, OH-2'), 5,52 (d, 1H, $J=5,0$ Hz, OH-3'), 5,99 (s, 1H, H-1'), 7,32 (d, 1H, $J=5,8$ Hz), 7,05 (ψ t, 2H, $J=7,7$ Hz), 7,62 (ψ t, 1H, $J=7,3$ Hz), 8,00 (d, 2H, $J=7,3$ Hz), 8,14 (d, 1H, $J=6,9$ Hz), 11,22 (s, 1H, NH). Tính toán theo phân tích đối với $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6, 0,5 \text{ H}_2\text{O}$: C, 55,13; H, 5,44; N, 11,35. Thực nghiệm: C, 55,21; H, 5,47; N, 11,33.

Bước 4: Hợp chất 16-3 (46,0 g, 0,13 mol) được hòa tan trong pyridin khan và cô tới khô trong chân không. Sirô thu được được hòa tan trong pyridin khan trong môi trường argon và làm lạnh xuống 0°C có khuấy. Dung dịch màu nâu được xử lý bằng cách nhỏ giọt benzoyl clorua (30 mL, 0,250 mol) trong thời gian 10 phút. Bể nước đá được lấy ra và tiếp tục khuấy trong thời gian 1,5 giờ, nhờ đó TLC cho thấy không còn nguyên liệu ban đầu. Phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung nước (5 mL) và cô tới khô. Phần còn lại được hòa tan trong lượng tối thiểu của CH_2Cl_2 và rửa bằng NaHCO_3 bão hoà (1x500 mL) và H_2O (1x500 mL). Pha hữu cơ được làm khô (Na_2SO_4) và được lọc, cô tới khô và được sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng gradien từng bước của EtOAc-hexan (25-60%) để tạo ra hợp chất 16-4 dưới dạng bột màu vàng (hợp chất 4-4 từ US 7,429,572) (48,5 g, 67%). ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,64 (s, 3H, CH_3), 4,50 (m, 1H, H-4), 4,78-4,85 (m, 2H, H-5',5a'), 5,50 (d, 1H, $J=3,4$ Hz, H-3'), 6,42 (s, 1H, H-1), 7,44-7,54 (m, 7H, Ar), 7,57-7,66 (m, 3H, Ar), 7,94 (d, 2H, $J=7,8$ Hz), 8,05-8,09 (m, 4H, Ar), 8,21 (d, 1H, $J=7,3$ Hz). Tính toán theo phân tích đối với $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_8$: C, 65,37; H, 4,78; N, 7,38.

Thực nghiệm: C, 65,59; H, 4,79; N, 7,16.

Bước 5: Hợp chất 16-4 (7,50 g, 0,013 mol) được hòa tan trong toluen khan (150 mL) trong môi trường argon và làm lạnh xuống -20°C . DAST (2,5 mL, 18,9 mmol) được bổ sung từ từ và bể làm lạnh được lấy ra sau khi hoàn thành việc bổ sung.

Tiếp tục khuấy trong 1 giờ và rót hỗn hợp vào NaHCO_3 bão hoà (100 mL) và rửa cho đến khi sự thoát khí ngừng lại. Pha hữu cơ được làm khô (Na_2SO_4), cô, và được tinh chế bằng sắc ký trên silicagel, rửa giải bằng 1: 1 EtOAc-hexan. Thu được 1,22 g (16,3%) hợp chất 16-5 tinh khiết (hợp chất 4-5 từ US 7,429,572 dưới dạng chất rắn màu trắng. Mp 241°C (CH_2Cl_2 -hexan); ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,49 (d, 3H, $J=22,4$ Hz, CH_3), 4,64 (dd, 1H, $J=3,44, 12,9$ Hz, H-5'), 4,73 (d, 1H, $J=9,5$ Hz, H-4'), 4,90 (dd, 1H, $J=2,4, 12,7$ Hz, H-5a'), 5,56 (dd, 1H, $J=8,6, 20,7$ Hz, H-3'), 6,52 (d, 1H, $J=18,0$ Hz, H-1'), 7,47-7,57 (m, 7H, Ar), 7,62-7,71 (m, 3H, Ar), 7,89 (d, 2H, $J=6,9$ Hz), 8,07-8,11 (m, 5H, Ar), 8,67 (bs, 1H, NH). ^{19}F NMR (CDCl_3): δ 3,3 (m). Tính toán theo phân tích đối với $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_7 \cdot 0,7 \text{H}_2\text{O}$: C, 63,74; H, 4,72; N, 7,20. Thực nghiệm: C, 63,71; H, 4,54; N, 7,20.

Bước 6: Hợp chất 16-5 (6,30 g, 0,011 mol) được tạo huyền phù trong dung dịch amoniac trong metanol (khoảng 7N, 150 mL) và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Loại bỏ dung môi trong chân không, làm bay hơi đồng thời với metanol (1x20 mL), và hấp phụ trước lên trên silicagel. Bột màu trắng được tải lên trên cột silicagel (được đóng gói trong CHCl_3) và cột được rửa giải bằng 9% EtOH trong CHCl_3 , sau đó là 17% EtOH và cuối cùng là 25% EtOH trong CHCl_3 . Cô phân đoạn chứa sản phẩm, lọc qua đĩa loại 0,4 μm , và làm đông khô từ nước, tạo ra hợp chất 16-6 (hợp chất 4-6 từ US 7,429,572), 2,18 g (76%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,17 (d, 3H, $J=22,3$ Hz, CH_3), 3,63 (dd, 1H, $J=2,7, 13,7$ Hz, H-5'), 3,70-3,84 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,24 (app s, 1H, OH-3'), 5,60 (d, 1H, $J=5,4$ Hz, H-5'), 5,74 (d, 1H, $J=7,71$ Hz, H-5), 6,07 (d, 1H, $J=18,9$ Hz, H-1'), 7,31 (s, 1H, NH_2), 7,42 (s, 1H, NH_2), 7,90 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, H-6). ^{19}F NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 2,60 (m). Tính toán theo phân tích đối với $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_{4,4,1,4} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 44,22; H, 5,95; N, 14,77. Thực nghiệm: C, 42,24; H, 5,63; N, 14,54. Hợp chất 16-6 (0,10 g, 0,386 mmol) được chuyển hóa thành muối hydroclorua bằng cách hòa tan trong nước (2 mL) và điều chỉnh độ pH đến khoảng 3,0 bằng HCl 1M. Nước được loại bỏ trong chân không và phần còn lại được kết tinh từ EtOH trong nước để thu được 16-6 dưới dạng muối hydroclorua (71,0 mg). Mp 243°C (phân hủy); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,29 (d, 3H, $J=22,6$ Hz, CH_3), 3,65 (dd, 1H, $J=2,3, 12,7$ Hz, H-5'), 3,76-3,90 (m, 3H, H-3', H-4', H-5a'), 5,96 (d, 1H, $J=17,3$ Hz, H-1'), 6,15 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, H-5), 8,33 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, H-6), 8,69 (s, 1,5H, NH), 9,78 (s, 1,5H, NH). ^{19}F NMR ($\text{DMSO}-d_4$): δ 1,69 (m). Tính toán theo phân tích đối với

C₁₀H₁₄FN₃O₄.HCl: C, 40,62; H, 5,11; N, 14,21. Thử nghiệm: C, 40,80; H, 5,09; N, 14,23.

Ví dụ sinh học

Quy trình thử nghiệm

Thử nghiệm đơn vị sao chép thông lượng cao (HTBS: High throughput replicon assay)

Các tế bào đơn vị sao chép mang ARN HCV H77 (kiểu gen 1a) hoặc Con1 (kiểu gen 1b) và gen thông báo Renilla luxiferaza được cấy trong các đĩa màu đen loại 384 giếng với mật độ là $1,6 \times 10^3$ tế bào cho mỗi giếng trong 90 μ L môi trường nuôi cấy DMEM không bao gồm G-418. Hợp chất được pha loãng theo dãy trong 100% DMSO và bổ sung vào tế bào ở dịch pha loãng 1:225, đạt được nồng độ cuối cùng là 0,44% DMSO trong tổng thể tích là 90 μ L bằng Biotek μ Flow Workstation. Các đĩa tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO₂ trong thời gian 3 ngày, sau đó môi trường nuôi cấy được loại ra và tế bào được thử nghiệm về hoạt tính luxiferaza với vai trò là yếu tố đánh dấu về mức độ sao chép. Sự biểu hiện luxiferaza được đo bằng cách sử dụng chất phản ứng thử nghiệm Dual-Glo luxiferaza (Promega, Madison, WI). Nói chung, 20 μ L chất đệm Dual-Glo luxiferaza được bổ sung vào để làm tan tế bào trong 10 phút và sau đó 20 μ L cơ chất Dual-Glo Stop & Glo đã được pha loãng (1:100) được bổ sung vào mỗi giếng. Tín hiệu phát quang được đo trên thiết bị đọc đĩa Perkin Elmer Envision sau khi ủ trong thời gian 10 phút. Hàm lượng luxiferaza được chuyển đổi thành tỷ lệ phần trăm so với đối chứng không được xử lý (được xác định là 100%) và dữ liệu được làm khớp với phương trình đáp ứng liều lượng logistic $y = a/(1+(x/b)^c)$ bằng cách sử dụng phần mềm XLFit4 (IDBS, Emeryville, CA). Giá trị EC₅₀ được tính toán từ phương trình thu được.

Theo cách khác, hoạt tính kháng virus có thể được phân tích bằng cách xác định IC₅₀ của HCV NS3 Proteaza.

Hoạt tính HCV NS3 proteaza được theo dõi bằng cách sử dụng cơ chất depsipeptit truyền năng lượng cộng hưởng sự phát huỳnh quang (FRET) (RET S1, Anaspec, San Jose, CA) dựa trên phương pháp nêu trong tài liệu Taliani, Taliani M, Bianchi E, Narjes F, Fossatelli M, Urbani A, Steinkuhler C, et al. A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer depsipeptide substrate.

Anal. Biochem. 1996; 240 (1):60-7, được nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo về việc thực hiện thử nghiệm này.

Nói chung, 2-10nM miền NS3 proteaza đã được tinh chế được ủ trước ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút với 20µM đồng yếu tố peptit NS4A đẳng hợp tử (Sigma, St. Louis, MO), trong 40% chất đệm glyxerol với 50 mM HEPES có pH là 7,5 và 10 mM DTT. Hợp chất được pha loãng theo dãy 1:3 trong DMSO, được ủ với hỗn hợp enzym/dồng yếu tố trong 10 phút và phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 2 µM cơ chất RET S1 (nồng độ cuối cùng). Mức tăng phát huỳnh quang được đo liên tục trong thời gian một giờ bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa phát huỳnh quang Victor3 V (Perkin Elmer, Waltham, MA). Vận tốc ban đầu được tính toán đối với mỗi nồng độ chất ức chế bằng cách sử dụng phần mềm Workout 1.5 (DAZDAQ, East Sussex, UK) với thuật toán độ dốc tối đa. Dữ liệu vận tốc được chuyển đổi thành tỷ lệ phần trăm so với đối chứng không được xử lý (được xác định là 100%) và phép hồi quy không tuyến tính được tiến hành để tính nồng độ ức chế 50% (giá trị IC₅₀).

Hiệu lực của enzym NS3: NS3 proteaza đã được tinh chế được tạo phức với peptit NS4A và sau đó được ủ với dịch pha loãng theo dãy của hợp chất (DMSO được dùng làm dung môi). Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung cơ chất peptit được gắn nhãn kép và đo sự tăng động học phát huỳnh quang thu được. Phép hồi quy không tuyến tính đối với dữ liệu vận tốc được tiến hành để tính các giá trị IC₅₀. Hoạt tính trước hết được thử nghiệm dựa vào proteaza kiểu gen 1b. Tùy thuộc vào hiệu lực thu được dựa vào kiểu gen 1b, các kiểu gen (1a, 2a, 3) và hoặc các enzym kháng chất ức chế proteaza (các thể đột biến D168Y, D168V, hoặc A156T) khác có thể được thử nghiệm. BILN-2061 được sử dụng làm đối chứng trong tất cả các thử nghiệm. Hợp chất nêu trong các ví dụ được đánh giá trong thử nghiệm này và được xác định là có các giá trị IC₅₀ nhỏ hơn khoảng 1 µM.

Hiệu lực của đơn vị sao chép và khả năng gây độc tế bào: Tế bào Huh-luc (đơn vị sao chép Bartenschlager's I389luc-ubi-neo/NS3-3'/ET kiểu gen 1b sao chép ổn định) được xử lý bằng dịch pha loãng theo dãy của hợp chất (DMSO được sử dụng làm dung môi) trong thời gian 72 giờ. Số lượng bản sao của đơn vị sao chép được đo bằng sự phát quang sinh học và phép hồi quy không tuyến tính được tiến hành để tính các giá trị EC₅₀. Các đĩa tương tự đã được xử lý bằng cùng dịch pha loãng thuốc được thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống

của tế bào Promega CellTiter-Glo. Tùy thuộc vào hiệu lực đạt được dựa vào đơn vị sao chép 1b, hợp chất có thể được thử nghiệm dựa vào đơn vị sao chép kiểu gen 1a và/hoặc đơn vị sao chép kháng chất ức chế mã hóa cho đột biến D168Y hoặc A156T. BILN-2061 được sử dụng làm đối chứng trong tất cả các thử nghiệm. Hợp chất nêu trong các ví dụ được đánh giá trong thử nghiệm này và được xác định là có các giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 5 μM .

Ảnh hưởng của protein huyết thanh đối với hiệu lực của đơn vị sao chép

Thử nghiệm về đơn vị sao chép được tiến hành trong môi trường nuôi cấy tế bào bình thường (DMEM + 10% FBS) có bổ sung nồng độ sinh lý của albumin huyết thanh người (40 mg/mL) hoặc α -axit glycoprotein (1 mg/mL). Các giá trị EC_{50} trong điều kiện có mặt protein huyết thanh người được so sánh với EC_{50} trong môi trường bình thường để xác định số lần thay đổi về hiệu lực.

Độ chọn lọc enzym: Tác dụng ức chế của proteaza ở động vật có vú bao gồm elastaza tụy lợn, elastaza bạch cầu người, proteaza 3, và cathepsin D được đo ở K_m đối với cơ chất tương ứng với mỗi enzym. IC_{50} đối với mỗi enzym được so sánh với IC_{50} thu được với NS3 1b proteaza để tính độ chọn lọc.

Khả năng gây độc tế bào MT-4: các tế bào MT4 được xử lý bằng dịch pha loãng theo dãy của hợp chất trong thời gian năm ngày. Khả năng sống của tế bào được đo khi kết thúc thời gian xử lý bằng cách sử dụng thử nghiệm Promega CellTiter-Glo và phép hồi quy không tuyến tính được tiến hành để tính CC_{50} .

Nồng độ hợp chất có liên quan đến các tế bào ở EC_{50} : Giống cây Huh-luc được ủ với hợp chất ở các nồng độ bằng EC_{50} . Ở các thời điểm khác nhau (0 – 72 giờ), các tế bào được rửa 2X bằng môi trường lạnh và chiết bằng 85% axetonitril; mẫu của môi trường ở mỗi thời điểm cũng được chiết. Các phân chiết tế bào và môi trường được phân tích bằng LC/MS/MS để xác định nồng độ mol của hợp chất trong mỗi phân đoạn.

Độ hòa tan và độ ổn định: Độ hòa tan được xác định bằng cách lấy một lượng nhỏ của dung dịch gốc DMSO 10mM và điều chế hợp chất ở nồng độ cuối cùng là 100 μM trong dung dịch môi trường thử nghiệm (PBS, độ pH là 7,4 và HCl 1,0N, độ pH là 1,5) với tổng nồng độ DMSO là 1%. Dung dịch môi trường thử nghiệm được ủ ở nhiệt độ trong phòng có lắc trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch được ly tâm và dịch nổi bề

mặt thu được được thử nghiệm trên HPLC/UV. Độ hòa tan có thể được tính toán bằng cách so sánh lượng hợp chất được phát hiện trong dung dịch thử nghiệm được xác định so với lượng được phát hiện trong DMSO ở cùng nồng độ. Độ ổn định của hợp chất sau 1 giờ ủ trong môi trường thử nghiệm ở nhiệt độ 37°C cũng được xác định.

Độ ổn định trong tế bào gan người, chó và chuột được bảo quản lạnh sâu: Mỗi hợp chất được ủ trong thời gian lên đến 1 giờ trong huyền phù tế bào gan (100 μ L, 80000 tế bào cho mỗi giếng) ở nhiệt độ 37°C. Tế bào gan được bảo quản lạnh sâu được hoàn nguyên trong môi trường ủ không chứa huyết thanh. Huyền phù được chuyển vào đĩa 96 giếng (50 μ L/giếng). Hợp chất được pha loãng đến 2 μ M trong môi trường ủ và sau đó bổ sung vào huyền phù tế bào gan để bắt đầu ủ. Mẫu được lấy ở nhiệt độ 0, 10, 30 và 60 phút sau khi bắt đầu ủ và phản ứng có thể được làm dừng bằng hỗn hợp gồm 0,3% axit formic trong 90% axetonitril/10% nước. Nồng độ hợp chất trong mỗi mẫu được phân tích bằng cách sử dụng LC/MS/MS. Thời gian bán biến của hợp chất trong huyền phù tế bào gan được xác định bằng cách làm khớp dữ liệu nồng độ-thời gian với phương trình mũ một pha. Dữ liệu cũng được mở rộng để thể hiện sự thanh thải gan nội tại và/hoặc sự thanh thải gan tổng cộng.

Độ ổn định trong phân đoạn S9 ở gan từ người, chó, và chuột: Mỗi hợp chất được ủ trong thời gian lên đến 1 giờ trong huyền phù S9 (500 μ L, 3 mg protein/mL) ở nhiệt độ 37°C ($n = 3$). Hợp chất được bổ sung vào huyền phù S9 để bắt đầu ủ. Mẫu được lấy ở 0, 10, 30, và 60 phút sau khi bắt đầu ủ. Nồng độ hợp chất trong mỗi mẫu được phân tích bằng cách sử dụng LC/MS/MS. Thời gian bán biến của hợp chất trong huyền phù S9 được xác định bằng cách làm khớp dữ liệu nồng độ-thời gian với phương trình mũ một pha.

Khả năng thấm Caco-2: Cả khả năng thấm xuôi (A-vào-B) và ngược (B-vào-A) đều được đo. Lớp đơn Caco-2 được cho sinh trưởng đến lúc hợp lưu trên màng polycarbonat, vi lỗ, được phủ collagen trong các đĩa Costar Transwell® loại 12 giếng. Hợp chất được cấp liều lên phía đỉnh đối với khả năng thấm xuôi (A-vào-B), và được cấp liều lên phía đáy đối với khả năng thấm ngược (B-vào-A). Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO₂ trong thiết bị ủ đã được tạo ẩm. Khi bắt đầu ủ, vào thời điểm 1 giờ và 2 giờ sau khi ủ, một lượng nhỏ là 200 μ L được lấy từ buồng tiếp nhận và

được thay thế bằng chất đệm thử nghiệm mới. Nồng độ hợp chất trong mỗi mẫu được xác định bằng LC/MS/MS. Khả năng thẩm biểu kiến, Papp, được tính toán.

Liên kết protein huyết tương: Liên kết protein huyết tương được đo bằng kỹ thuật thẩm tách cân bằng. Mỗi hợp chất được pha vào huyết tương trong ở nồng độ cuối cùng là 2µM. Huyết tương đã được pha và dung dịch đệm phosphat được đặt vào các mặt đối diện của các tế bào thẩm tách được hợp dịch, sau đó được quay từ từ trong bể nước 37°C. Khi kết thúc ủ, nồng độ hợp chất trong huyết tương và dung dịch đệm phosphat được xác định. % không liên kết được tính toán bằng cách sử dụng phương trình sau:

$$\% \text{ Không liên kết} = 100 \cdot \left(\frac{C_f}{C_b + C_f} \right)$$

trong đó C_f và C_b là các nồng độ tự do và liên kết được xác định là nồng độ chất đệm và huyết tương sau thẩm tách, một cách tương ứng.

Mô tả sơ lược CYP450: Mỗi hợp chất được ủ với mỗi trong số 5 enzym CYP450 tái tổ hợp ở người, bao gồm CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 và CYP2C19 trong sự có mặt và vắng mặt của NADPH. Mẫu theo dõi có thể được lấy từ hỗn hợp ủ khi bắt đầu của ủ và ở thời điểm 5, 15, 30, 45 và 60 phút sau khi bắt đầu ủ. Nồng độ hợp chất trong hỗn hợp ủ được xác định bằng LC/MS/MS. Tỷ lệ phần trăm của hợp chất còn lại sau khi ủ ở mỗi thời điểm được tính toán bằng cách so sánh với mẫu khi bắt đầu ủ.

Độ ổn định trong huyết tương chuột, chó, khỉ và người: Hợp chất được ủ trong thời gian lên đến 2 giờ trong huyết tương (chuột, chó, khỉ, hoặc người) ở nhiệt độ 37°C. Hợp chất được bổ sung vào huyết tương ở nồng độ cuối cùng là 1 và 10 µg/mL. Các lượng nhỏ được lấy ở thời điểm 0, 5, 15, 30, 60, và 120 phút sau khi bổ sung hợp chất. Nồng độ hợp chất và chất chuyển hoá chính ở mỗi thời điểm được đo bằng LC/MS/MS. Dữ liệu sinh học (hiệu lực kháng virus [EC₅₀]) được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm thông báo đơn vị sao chép HCV dựa trên Renilla luxiferaza (RLuc)–HCV 1b RLuc).

Ví dụ sinh học 7: Tính kháng chéo của hợp chất 10 và hợp chất 6

Nghiên cứu này được tiến hành để xác định đặc tính kháng chéo in vitro của hợp chất 10 và hợp chất 6. Tập hợp các đơn vị sao chép đột biến HCV mang đột biến kháng thuốc HCV nucleosit NS5B ký hiệu S282T hoặc đột biến kháng thuốc HCV NS5A in vitro và in vivo phổ biến nhất được nghiên cứu qua thử nghiệm đơn vị sao chép nhất thời để xác định xem liệu tính kháng chéo có tồn tại giữa các đột biến mà làm giảm độ nhạy đối với hợp chất 10 hoặc hợp chất 6 hay không. Không quan sát thấy tính kháng chéo giữa các hợp chất này đối với đơn vị sao chép đột biến S282T mà vẫn hoàn toàn nhạy với hợp chất 6 và các thể đột biến NS5A không thể hiện độ nhạy giảm đối với hợp chất 10.

Nguyên liệu và phương pháp

Chất phản ứng

Hợp chất

Hợp chất 6 và hợp chất 10 được tổng hợp bởi Gilead Sciences, Inc. ở Foster City, CA.

Các dòng tế bào

Huh-lunet, dòng Huh-7 mà cho phép sao chép HCV với mức độ cao, thu được từ ReBLikon GmbH (Mainz, Đức). Các tế bào Huh-lunet được duy trì trong môi trường Eagle được cải biến bởi Dulbecco (DMEM; GIBCO, Carlsbad, CA) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS; Hyclone, Logan, UT). Các tế bào được duy trì ở 37°C trong thiết bị ủ đã được tạo ẩm (độ ẩm 85%) và trong môi trường khí CO₂ 5%.

PI-hRluc, đơn vị sao chép bicistron mã hóa cho gen Renilla luxiferaza sau IRES bại liệt và gen không cấu trúc kiểu gen HCV 1b (chủng Con-1) (NS3 - NS5B) sau EMCV IRES, được sử dụng cho các nghiên cứu chuyển nhiễm tạm thời. Plasmid pPI-hRluc được tạo ra từ plasmid pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET, mà mã hoá cho đơn vị sao chép dưới hệ gen kiểu gen 1b (chủng Con-1) và thu được từ ReBLikon (Friebe et al., J Virol 2001;75 (24):12047-57). Gen hRluc được khuếch đại PCR từ pF9 CMV hRluc-neo Flexi(R) (Promega, Madison, WI) bằng PCR sử dụng Accuprime Super Mix I (Invitrogen, Carlsbad, CA) và các đoạn mồi PV_Rluc_Top và 3'-Rluc(NotI). Hai đoạn mồi này có các trình tự sau đây và mang các vị trí giới hạn để tách dòng tiếp: PV_Rluc_Top: 5' ATC AGA CAA TTG TAT CAT AAT GGC TTC CAA GGT GTA

CG 3' (SEQ ID NO:3); 3'-Rluc(NotI): 5' ACG TCA CTA TCT ACG CGG CCG CTT ACT GCT CGT TCT TC3' (vị trí NotI được gạch chân) (SEQ ID NO:4). Vùng khởi đầu T7, 5'UTR và IRES của virus bại liệt được khuếch đại PCR từ plasmit pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET bằng cách sử dụng các đoạn mồi 5'-P7(SbfI) và PV_Rluc_Bottom. Hai đoạn mồi này có các trình tự sau đây và mang các vị trí giới hạn để tách dòng tiếp: 5'-P7(SbfI): 5' CAA GCT AAG CTG CCT GCA GG T 3' (vị trí SbfI được gạch chân) (SEQ ID NO:5); PV_Rluc_Bottom: 5' CGT ACA CCT TGG AAG CCA TTA TGA TAC AAT TGT CTG AT (SEQ ID NO:6). Các mảnh PCR sau đó từ hai phản ứng trên đây sau đó được kết hợp với nhau bằng cách sử dụng PCR gộp lên nhau và các đoạn mồi 5'- P7(SbfI) và 3'-Rluc(NotI). Sản phẩm khuếch đại P7-5'UTR-IRES của virus bại liệt-hRluc hoàn chỉnh được tách dòng phụ vào pCR2.1-TOPO. Plasmit thu được được phân cắt bằng SbfI và NotI, và các mảnh cắt được (P7-5'UTR-IRES của virus bại liệt-hRluc) được nối bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza vào pFKI341 PI-Luc/NS3-3'/ET được phân cắt bằng cùng enzym. Vector thu được, pPI-hRluc, được giải trình tự để xác nhận chiều và trình tự đúng của vùng P75'UTR-IRES của virus bại liệt-hRluc của plasmit.

Các đơn vị sao chép GT 1a và 2a chứa hRluc đã được mô tả trước đây (Robinson M, Yang H, Sun SC, Peng B, Tian Y, Pagratis N, et al. Novel HCV Reporter Replicon Cell Lines Enable Efficient Antiviral Screening against Genotype 1a. *Antimicrob Agents Chemother* 2010).

Đơn vị sao chép PI-hRluc được sử dụng dưới dạng mạch chính để tạo cấu trúc thể khảm. Sự làm khuyết bên trong được tạo ra trong NS5B, làm cho nó mất khả năng sao chép. 413 cặp bazơ cuối cùng (mã hoá cho 137 axit amin NS5A cuối cùng) của 1b-con-1 NS5A được tổng hợp trong khung với các trình tự NS5B từ các kiểu gen 2b, 3a, 4a, 5a và 6a (Genscript Inc. Piscataway NJ). Các trình tự NS5B liên ứng đối với mỗi trong số các kiểu gen này thu được từ việc sắp thẳng hàng các trình tự được nộp lưu trong cơ sở dữ liệu HCV châu Âu và chiết trình tự liên ứng. Các trình tự liên ứng mới đối với NS5B này, cũng như các trình tự thu được từ thể phân lập lâm sàng cụ thể (Herlihy et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52 (10):3523-31) được sử dụng để tạo cấu trúc đơn vị sao chép NS5B dạng khảm. Vị trí XhoI duy nhất được sử dụng ở đầu 5' và vị trí AseI duy nhất ở đầu 3' để tách dòng định hướng vào vector 1b-hRluc/NeoR NS5B bằng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn.

Các đột biến NS5B S282T được đưa vào plasmit đơn vị sao chép bằng cách sử dụng bộ kit gây đột biến QuikChange II XL theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Stratagene, La Jolla, CA). Đơn vị sao chép đột biến nguyên vẹn được giải trình tự để xác định sự có mặt của đột biến S282T và sự vắng mặt của các đột biến điểm thứ cấp bất kỳ.

Đơn vị sao chép đột biến NS5A được tạo ra bằng cách tổng hợp trình tự mã hóa cho 149 axit amin đầu tiên của NS5A chứa đột biến mong muốn có lẽ là vị trí BsrGI và EcoRI 5' và 3', một cách tương ứng (Genscript, Piscataway, NJ). Mảnh được tổng hợp sau đó được tách dòng bằng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn vào plasmit đơn vị sao chép Rluc 1a được cải biến để có thể tách dòng vào các vị trí giới hạn BsrGI và EcoRI duy nhất. Các đột biến được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

Đơn vị sao chép được tạo mạch thẳng bằng cách sử dụng các enzym sau đây: Spe I (đơn vị sao chép dựa trên PI-Rluc 1b), Hpa I (đơn vị sao chép dựa trên Rluc 1a), và XbaI/HpaI (đơn vị sao chép Rluc2a). ARN của đơn vị sao chép được phiên mã in vitro từ plasmit mã hóa đơn vị sao chép bằng cách sử dụng bộ kit phiên mã in vitro T7 Ribomax (Promega; Madison, WI), sau đó là tinh chế bằng cách sử dụng cột RNAeasy (Qiagen; Valencia, CA).

Thử nghiệm

Xác định độ nhạy thuốc bằng cách sử dụng thử nghiệm đơn vị sao chép chuyển nhiễm tạm thời

ARN được chuyển nhiễm vào các tế bào Huh-lunet bằng cách sử dụng phương pháp của Lohmann et al. (Lohmann et al., Science 1999;285 (5424):110-3) Nói chung, các tế bào được phân giải bằng trypsin và rửa hai lần bằng PBS. Huyền phù chứa 4×10^6 tế bào trong 400 μ L PBS được trộn với 5 μ g ARN và được đục lỗ điện bằng cách sử dụng các thiết đặt là 960 μ F và 270 V. Các tế bào được chuyển vào 40 mL môi trường nuôi cấy được làm ấm sẵn và sau đó được cấy vào đĩa loại 96 giếng hoặc đĩa loại 384 giếng. Hợp chất được pha loãng theo dãy 3 lần trong 100% DMSO và bổ sung vào tế bào để đạt được nồng độ DMSO cuối cùng là 0,5%. Các tế bào được xử lý trong thời gian ba ngày, sau đó môi trường nuôi cấy được loại ra, các tế bào được làm tan, và hoạt tính Renilla luxiferaza được định lượng bằng cách sử dụng chất phản ứng có

trên thị trường (Promega) và thiết bị Victor hoặc Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Phân tích dữ liệu

Dữ liệu được chuyển đổi thành tỷ lệ phần trăm so với đối chứng không được xử lý (được xác định là 100%), và các giá trị EC_{50} được tính toán bằng cách hồi quy không tuyến tính hai tập dữ liệu bản sao bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism hoặc Pipeline Pilot. Sự thay đổi số lần kháng được tính dưới dạng tỷ lệ của EC_{50} đơn vị sao chép đột biến so với EC_{50} đơn vị sao chép kiểu dại.

Kết quả

Hoạt tính của hợp chất 10 và hợp chất 6 kháng S282T

Sự chọn lọc tính kháng in vitro trước đây với hợp chất 10 được xác nhận nhất quán S282T trong NS5B là đột biến bậc một trong nhiều kiểu gen (GT 1b, 1a và 2a). Đột biến S282T NS5B sau đó được đưa vào đơn vị sao chép GT 1a, 1b, và 2a nguyên chiều dài và đơn vị sao chép khả năng chứa trình tự NS5B 2b, 3a, hoặc 4a được tách dòng vào mạch chính GT1b. Độ nhạy với hợp chất 10, hợp chất 6, và ribavirin (RBV) được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm sao chép nhất thời. Đột biến S282T thể hiện độ nhạy giảm đối với hợp chất 10 với các giá trị EC_{50} qua tất cả năm kiểu gen nằm trong khoảng từ 117,1 nM đến 346,1 nM. Số lần tăng lên của EC_{50} đối với S282T nằm trong khoảng từ 2,4 đến 16,0 so với kiểu dại từ các kiểu gen tương ứng, chứng tỏ độ nhạy giảm của đơn vị sao chép đối với hợp chất 10 khi có mặt đột biến S282T NS5B.

Đối với đơn vị sao chép kiểu dại, các giá trị EC_{50} đối với RBV cũng tương tự qua năm kiểu gen được thử nghiệm với EC_{50} thấp nhất là dựa vào GT 2b. Đáng lưu ý là, các giá trị EC_{50} đối với đơn vị sao chép S282T nhạy hơn từ 5 đến 10 lần với việc điều trị bằng RBV so với kiểu dại tương ứng của chúng đối với tất cả năm kiểu gen. Không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể ở EC_{50} của hợp chất 6 giữa đơn vị sao chép kiểu dại và đơn vị sao chép S282T, cho thấy rằng đột biến này không làm thay đổi độ nhạy với hợp chất 6. Tóm lại, mặc dù đơn vị sao chép S282T làm giảm độ nhạy giảm đối với hợp chất 10, nhưng đơn vị sao chép đột biến này đã chứng tỏ độ nhạy kiểu dại đối với hợp chất 6 và độ nhạy tăng lên đối với sự ức chế bởi RBV so với kiểu dại.

Bảng 7.1. Hoạt tính kháng virut của hợp chất 10 và RBV kháng lại kiểu đại và thể đột biến S282T GT 1b, 2a, 2b, 3a và 4a

Đơn vị sao chép	Hợp chất 10			RBV			Hợp chất 6		
	EC ₅₀ nM ^a		Số lần thay đổi ^b	EC ₅₀ nM ^a		Số lần thay đổi ^b	EC ₅₀ nM ^a		Số lần thay đổi ^b
	WT	S282T		WT	S282T		WT	S282T	
GT1b	21,5	189,2	8,8	6,6	1,6	0,2	0,5	0,4	0,8
GT2a	146,8	346,1	2,4	8,3	0,6	0,1	5165	2336	0,5
GT2b	13,3	215,6	16,2	2,6	0,6	0,2	0,5	0,5	0,9
GT3a	33,9	117,1	3,5	6,7	1,0	0,2	0,4	0,2	0,6
GT4a	35,8	217,5	6,1	6,2	0,6	0,1	0,5	0,4	0,8

a EC₅₀ thể hiện giá trị trung bình của hai hoặc nhiều thí nghiệm độc lập.

b Số lần thay đổi so với kiểu đại tương ứng

Hoạt tính của hợp chất 10 và hợp chất 6 kháng lại các thể đột biến NS5A

Để xác định xem liệu thể đột biến kháng thuốc NS5A có tính kháng chéo đối với hợp chất 10 hay không, tập hợp các đơn vị sao chép đột biến NS5A được thử nghiệm về độ nhạy đối với cả hợp chất 6 và hợp chất 10. Tất cả bảy thể đột biến NS5A thể hiện độ nhạy giảm đối với hợp chất 6 với mức tăng EC₅₀ nằm trong khoảng từ 25 đến 3029 lần. Trái lại, không có sự thay đổi đáng kể nào về EC₅₀ được quan sát thấy đối với các thể đột biến NS5A so với hợp chất 10 hoặc với đối chứng RBV.

Bảng 7.2 Hoạt tính in vitro của hợp chất 10 hoặc hợp chất 6 kháng lại các thể đột biến NS5A trong kiểu gen 1a

Hợp chất	Số lần thay đổi về EC ₅₀ (DRM EC ₅₀ / 1a-H77 EC ₅₀)						
	M28T	Q30H	Q30R	Q30E	L31M	Y93C	Y93H
Hợp chất 6	25	73	170	997	140	327	3029
Hợp chất 10	0,9	1,0	0,8	1,0	1,1	ND	0,7
RBV	0,4	0,7	0,8	0,8	0,5		1,0

Kết luận

Trong ví dụ này, đặc tính kháng chéo của hợp chất 10 và hợp chất 6 được đánh giá bằng cách sử dụng đơn vị sao chép HCV tạm thời mã hóa cho các đột biến có tính

kháng đã biết ở NS5A và NS5B mà tạo ra độ nhạy giảm đối với hợp chất 6 và hợp chất 10, một cách tương ứng. Đơn vị sao chép S282T NS5B tạo ra độ nhạy giảm đối với hợp chất 10, mặc dù không có sự khác biệt đáng kể về EC₅₀ của hợp chất 6 được đo từ đơn vị sao chép kiểu dại và S282T. Một cách tương hỗ, các đột biến tạo ra độ nhạy giảm đối với hợp chất 6 vẫn nhạy với việc điều trị bằng hợp chất 10.

Nhìn chung, các kết quả này cho thấy rằng các đột biến có tính kháng đối với hợp chất 10 và hợp chất 6 không chứng tỏ tính kháng chéo và hỗ trợ cho việc sử dụng các hợp chất này trong liệu pháp kết hợp trong tương lai để điều trị HCV.

Ví dụ sinh học 8: Hoạt tính kết hợp

Dữ liệu của nghiên cứu kết hợp hợp chất 10 với chất ức chế NS5A là hợp chất 6, chất ức chế không nucleosit là hợp chất 1 hoặc hợp chất 5, chất ức chế proteaza là hợp chất 3, hoặc ribavirin (RBV) được thể hiện đối với thử nghiệm đơn vị sao chép in vitro mà là tiêu chuẩn để đánh giá hoạt tính kháng virus trên cơ sở tế bào của chất ức chế HCV. Các kết quả này cho thấy rằng hợp chất 10 có hoạt tính kháng virus cộng hợp khi được kết hợp với hợp chất 6, hợp chất 1, hợp chất 5 hoặc hợp chất 3. Ngoài ra, hợp chất 10 cũng thể hiện tính hiệp đồng nhỏ khi được kết hợp với RBV in vitro.

Nguyên liệu và phương pháp

Dòng tế bào và giống cây tế bào

Dòng tế bào đơn vị sao chép kiểu gen HCV 1a được sử dụng trong nghiên cứu này đã được mô tả từ trước (Robinson M, Yang H, Sun SC, Peng B, Tian Y, Pagratis N, et al. Novel HCV Reporter Replicon Cell Lines Enable Efficient Antiviral Screening against Genotype 1a. *Antimicrob Agents Chemother* 2010). Các tế bào được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy tế bào chứa môi trường Eagle được cải biến bởi Dulbecco (DMEM) với GlutaMAX (Gibco, Carlsbad, CA, Cat# 10569-044), có bổ sung 10% FBS (HyClone, Logan, UT, Cat# SH30071.03), 100 đơn vị/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, Cat# 15140-122), và 0,1mM axit amin không thiết yếu (Gibco, Carlsbad, CA, Cat#11140-050). Các tế bào đơn vị sao chép được duy trì trong 0,5 mg/mL geneticin (Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat# 10131-035) để ngăn ngừa sự mất đơn vị sao chép HCV. Các tế bào được cấy chuyển 3-4 ngày một lần trước khi đạt đến sự hợp lưu.

Thử nghiệm đơn vị sao chép HCV để xác định EC₅₀, CC₅₀ và nghiên cứu kết hợp

Tất cả các hợp chất được cung cấp trong 100% DMSO. Các lần pha loãng hợp chất theo dãy được tiến hành trong 100% DMSO. Tất cả các lần pha loãng theo dãy đều được tiến hành trong đĩa polypropylen loại 384 giếng (Thermo Scientific, Hudson, NH, Cat#4341) bằng cách sử dụng Biomek FX Workstation. Để xác định EC₅₀ và CC₅₀, hợp chất thử nghiệm được pha loãng theo dãy trong mười bước pha loãng 1:3 trong các cột 3-20 của đĩa loại 384 giếng. Đối với các nghiên cứu kết hợp, một hợp chất được pha loãng theo dãy trong chín bước pha loãng 1:2 theo phương nằm ngang với hợp chất còn lại được pha loãng theo dãy trong bảy bước pha loãng 1:2 theo phương thẳng đứng. Điều này giúp đạt được tập hợp xác định của các nồng độ và tỷ lệ thuốc khác nhau. Đối với mỗi thuốc cụ thể, giá trị EC₅₀ được chọn làm trung điểm của giới hạn nồng độ được thử nghiệm. Tất cả các bước pha loãng theo dãy được tiến hành với bốn lần lặp lại đối với mỗi hợp chất trong cùng đĩa loại 384 giếng. 100% DMSO được bổ sung vào cột 1-2 của mỗi đĩa loại 384 giếng chứa dịch pha loãng theo dãy. Chất ức chế proteaza HCV ITMN-191 ở nồng độ 100µM được bổ sung vào cột 23 làm đối chứng cho khả năng ức chế 100% đối với sự sao chép HCV, trong khi puromycin ở nồng độ 10mM được bổ sung vào cột 24 làm đối chứng cho khả năng gây độc tế bào 100%.

Bổ sung 90 µL môi trường nuôi cấy tế bào (không chứa geneticin) chứa 2000 tế bào đơn vị sao chép HCV đã được tạo huyền phù vào mỗi giếng của đĩa polystyren màu đen loại 384 giếng (Greiner Bio-one, Monroe, NC, Cat#781086, giống cấy tế bào đã được xử lý) bằng Biotek µFlow Workstation. Để chuyển hợp chất vào đĩa nuôi cấy tế bào, 0,4 µL dung dịch hợp chất từ đĩa chứa dịch pha loãng theo dãy của hợp chất được chuyển sang đĩa nuôi cấy tế bào trên Biomek FX Workstation. Nồng độ DMSO trong các giếng thử nghiệm cuối cùng là 0,44%. Các đĩa được ủ trong thời gian 3 ngày ở 37°C với 5% CO₂ và độ ẩm 85%.

Thử nghiệm đơn vị sao chép HCV là thử nghiệm nhiều thành phần mà có thể đánh giá cả khả năng gây độc tế bào và hoạt tính kháng đơn vị sao chép từ cùng một giếng. Thử nghiệm CC₅₀ được tiến hành trước tiên. Môi trường trong đĩa nuôi cấy tế bào loại 384 giếng được hút ra và các giếng được rửa bốn lần bằng 100 µL 1 X PBS mỗi lần, bằng cách sử dụng thiết bị rửa đĩa Biotek ELX405. Thể tích 50 µL của dung

dịch chứa calcein AM 400nM (Anaspec, Fremont, CA, Cat#25200-056) trong 1 X PBS được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa bằng Biotek μ Flow Workstation. Đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi đo tín hiệu huỳnh quang (kích thích 490 nm, phát xạ 520 nm) bằng thiết bị đọc đĩa Perkin Elmer Envision.

Thử nghiệm EC_{50} được tiến hành trong cùng các giếng như thử nghiệm CC_{50} . Dung dịch calcein-PBS trong đĩa nuôi cấy tế bào loại 384 giếng được hút ra bằng thiết bị rửa đĩa Biotek ELX405. Thể tích 20 μ L của chất đệm Dual-Glo luxiferaza (Promega, Madison, WI, Cat#E298B) được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa bằng Biotek μ Flow Workstation. Đĩa được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Thể tích 20 μ L của dung dịch chứa hỗn hợp 1:100 của cơ chất Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E313B) và chất đệm Dual-Glo Stop & Glo (Promega, Madison, WI, Cat#E314B) sau đó được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa bằng Biotek μ Flow Workstation. Đĩa sau đó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút trước khi đo tín hiệu phát quang bằng thiết bị đọc đĩa Perkin Elmer Envision.

Phân tích dữ liệu

Tác dụng gây độc tế bào được xác định bằng sự chuyển hoá calcein AM thành sản phẩm phát huỳnh quang. Tỷ lệ phần trăm gây độc tế bào được tính toán bằng phương trình 1:

$$\% \text{ gây độc tế bào hoặc } \% \text{ ức chế} = 100 \times \left(1 - \frac{X_C - M_B}{M_D - M_B}\right) \quad (1)$$

trong đó X_C là tín hiệu huỳnh quang từ giếng được xử lý bằng hợp chất; M_B là tín hiệu huỳnh quang trung bình từ các giếng được xử lý bằng puromycin; M_D là tín hiệu huỳnh quang trung bình từ các giếng được xử lý bằng DMSO. Hoạt tính kháng đơn vị sao chép HCV được xác định bằng tín hiệu phát quang được tạo ra từ renilla luxiferaza thông báo của đơn vị sao chép HCV. % ức chế đối với đơn vị sao chép HCV được tính toán bằng cách sử dụng phương trình 1, trong đó X_C là tín hiệu phát quang từ giếng được xử lý bằng hợp chất; M_B là tín hiệu phát quang trung bình từ các giếng được xử lý bằng ITMN-191; M_D là tín hiệu phát quang trung bình từ các giếng được xử lý bằng DMSO.

Các giá trị CC_{50} được xác định dưới dạng nồng độ hợp chất thử nghiệm mà gây ra sự giảm khả năng sống của tế bào là 50%. Các giá trị EC_{50} được xác định dưới dạng nồng độ hợp chất thử nghiệm mà gây ra sự giảm sao chép HCV là 50%. Cả giá trị CC_{50} và EC_{50} đều được thu nhận bằng cách sử dụng gói phần mềm Pipeline Pilot 5.0 (Accelrys, San Diego, CA) bằng cách làm khớp hồi quy không tuyến tính dữ liệu thể hiện với phương trình 2:

$$y = d + \frac{a - d}{[1 + (\frac{x}{c})^b]} \quad (2)$$

trong đó y là phần trăm ức chế quan sát được của đơn vị sao chép HCV ở nồng độ x của hợp chất; d là đáp ứng được ước tính ở nồng độ hợp chất tại giá trị không; a là đáp ứng được ước tính ở nồng độ hợp chất tại giá trị vô cùng; c là nồng độ ở khoảng giữa (CC_{50} hoặc EC_{50}); b là hệ số dốc Hill.

Dữ liệu thí nghiệm của nghiên cứu kết hợp được phân tích bằng cách sử dụng chương trình MacSynergy II được phát triển bởi Prichard và Shipman (Prichard MN, Aseltine KR, Shipman C, Jr. MacSynergyTM II, Version 1.0. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1993). Phần mềm này (MacSynergyTM II, University of Michigan, MI) tính toán mức độ ức chế theo lý thuyết với giả định rằng các thuốc có sự tương tác cộng hợp (dựa trên mẫu Bliss Independence), và định lượng sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các giá trị mức độ ức chế theo lý thuyết và quan sát được. Việc lập đồ thị các khác biệt này theo ba chiều tạo ra mặt phẳng trong đó sự nâng cao trong mặt phẳng Z thể hiện tính hiệp đồng kháng virus và sự hạ thấp thể hiện tính đối kháng kháng virus giữa các hợp chất. Các thể tích được tính toán của độ lệch mặt phẳng được thể hiện theo $\mu M^2\%$. Theo Prichard và Shipman, tác dụng kết hợp được xác định dưới dạng:

- Tính hiệp đồng mạnh: $> 100 \mu M^2\%$
- Tính hiệp đồng trung bình: > 50 và $\leq 100 \mu M^2\%$
- Tính hiệp đồng nhỏ: > 25 và $\leq 50 \mu M^2\%$
- Tính cộng hợp: ≤ 25 và $> -25 \mu M^2\%$
- Tính đối kháng nhỏ: ≤ -25 và $> -50 \mu M^2\%$

- Tính đối kháng trung bình: ≤ -50 và $> -100 \mu\text{M}^2\%$
- Tính đối kháng mạnh: $\leq -100 \mu\text{M}^2\%$

Đối với mỗi nghiên cứu kết hợp, ba thí nghiệm độc lập được tiến hành với bốn lần lặp lại trong mỗi thí nghiệm.

Kết quả

Hoạt tính kháng virus và khả năng gây độc tế bào của hợp chất cụ thể trong thử nghiệm đơn vị sao chép kiểu gen HCV 1a

Hoạt tính kháng HCV và khả năng gây độc tế bào của hợp chất 10 kết hợp với hợp chất kháng HCV khác được thử nghiệm trong các tế bào Huh-7 mang đơn vị sao chép kiểu gen HCV 1a. Các giá trị EC_{50} và CC_{50} đối với tất cả các hợp chất được liệt kê trong bảng dưới đây. Không quan sát thấy khả năng gây độc tế bào đáng kể đối với tất cả các hợp chất cụ thể lên đến nồng độ cao nhất được thử nghiệm trong thử nghiệm kết hợp.

Bảng 8.1. EC_{50} và CC_{50} của hợp chất được sử dụng trong nghiên cứu kháng đơn vị sao chép kiểu gen HCV 1a

Hợp chất	Nhóm	EC_{50}^a (nM)	CC_{50}^a (nM)
Hợp chất 10	Tiền dược chất nucleosit NS5B	39	>82446
Hợp chất 6	Chất ức chế NS5A	0,032	>44400
Hợp chất 1	Không phải nucleosit NS5B	18	>44400
Hợp chất 5	Không phải nucleosit NS5B	14	>44400
Hợp chất 3	Chất ức chế NS3 proteaza	46	>22200
RBV	Chất tương tự nucleosit	33626	>88800

^a Các giá trị là giá trị trung bình hình học đối với ba hoặc nhiều thí nghiệm độc lập

Hoạt tính kháng virus và khả năng gây độc tế bào của hợp chất 10 kết hợp với nhóm chất kháng HCV khác.

Tác dụng kháng virus của hợp chất 10 kết hợp với hợp chất kháng HCV khác được đánh giá bằng cách sử dụng đơn vị sao chép kiểu gen HCV 1a. Kết quả được phân tích bằng cách sử dụng MacSynergy II, mà tạo ra đồ thị mặt phẳng thể hiện độ

lệch đáng kể do cộng hợp. Mức độ hiệp đồng và đối kháng ($\mu\text{M}^2\%$) được tính toán từ độ lệch từ mặt phẳng cộng hợp được nêu tóm tắt trong bảng dưới đây. Ở khoảng tin cậy 95%, mức độ hiệp đồng và đối kháng trung bình nằm trong khoảng từ 25 đến $-25 \mu\text{M}^2\%$ khi hợp chất 10 được kết hợp với hợp chất 6, hợp chất 1, hợp chất 5 hoặc hợp chất 3, cho thấy sự tương tác cộng hợp với hợp chất 10. Ngoài ra, hợp chất 10 thể hiện mức độ hiệp đồng nằm trong khoảng từ 25 đến $50 \mu\text{M}^2\%$ khi kết hợp với RBV, thể hiện tương tác hiệp đồng nhỏ. Trong nghiên cứu kết hợp sử dụng chất kháng virus tác động trực tiếp cùng với hợp chất 10, khả năng sống của tế bào là lớn hơn 93% ở nồng độ cao nhất của chế phẩm kết hợp chứa hợp chất được thử nghiệm, mặc dù các nghiên cứu phân tích tác dụng kết hợp của hợp chất 10 và RBV cho thấy khả năng sống của tế bào lớn hơn 85% ở nồng độ thuốc kết hợp cao nhất.

Bảng 8.2. Định lượng tính hiệp đồng và tính đối kháng kháng virus và sự tương tác thuốc đối với các thuốc kết hợp với hợp chất 10

Hợp chất được sử dụng kết hợp với hợp chất 10	Nhóm	Mức độ hiệp đồng (nM^2) ^a	Mức độ đối kháng (nM^2) ^a	Tương tác
Hợp chất 6	Chất ức chế NS5A	$3,3 \pm 4,2$	$-7,7 \pm 13,3$	Cộng hợp
Hợp chất 1	Không phải nucleosit NS5B	$4,7 \pm 8,1$	$-11,7 \pm 10,0$	Cộng hợp
Hợp chất 5	Không phải nucleosit NS5B	$1,3 \pm 2,3$	$-5,7 \pm 9,0$	Cộng hợp
Hợp chất 3	Chất ức chế NS3 proteaza	$1,0 \pm 1,7$	$-3,0 \pm 4,4$	Cộng hợp
RBV	Chất tương tự nucleosit	$35,3 \pm 3,2$	$-2,0 \pm 2,0$	Tính hiệp đồng nhỏ

^a Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của ba thử nghiệm độc lập được tiến hành với bốn lần lặp lại

Bảng 8.3. Định lượng khả năng gây độc tế bào trong chế phẩm kết hợp chứa hợp chất

Hợp chất được sử dụng kết hợp với hợp chất 10	Nồng độ cao nhất của hợp chất được sử dụng với nồng độ cao nhất (320 nM) của hợp chất 10	Khả năng gây độc tế bào ở nồng độ cao nhất của chế phẩm kết hợp chứa hợp chất (phần trăm ức chế đối với sự sinh trưởng tế bào)
Hợp chất 6	0,16 nM	5,0 + 5,0
Hợp chất 1	120 nM	7,0 + 4,6
Hợp chất 5	64 nM	4,3 + 2,9
Hợp chất 3	240 nM	2,0 + 3,5
RBV	16000 nM	14,0 + 4,4

a Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của ba thử nghiệm độc lập được tiến hành với bốn lần lặp lại

Kết luận

Hoạt tính kháng virus của hợp chất 10 được thử nghiệm kết hợp với hợp chất 6, hợp chất 1, hợp chất 5, hợp chất 3 hoặc RBV. Hợp chất 10 cho thấy hoạt tính kháng virus cộng hợp kết hợp với hợp chất 6, hợp chất 1, hợp chất 5 hoặc hợp chất 3, và tính hiệp đồng nhỏ với RBV.

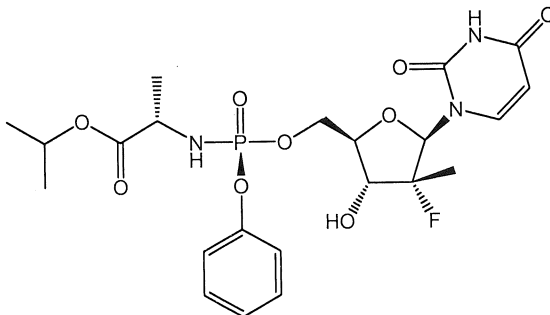
Tóm lại, các phát hiện này chứng tỏ rằng có thể sử dụng hợp chất 10 kết hợp với hợp chất 6, hợp chất 1, hợp chất 5, hợp chất 3 hoặc RBV để nâng cao hiệu quả ức chế virus mà không làm giảm hiệu lực của thuốc cụ thể bất kỳ.

Mặc dù các phương án cụ thể của sáng chế được minh họa và được mô tả chi tiết trong bản mô tả này, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Do đó, phần mô tả chi tiết nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và không được hiểu là làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

YÊU CẦU BẢO HỘ

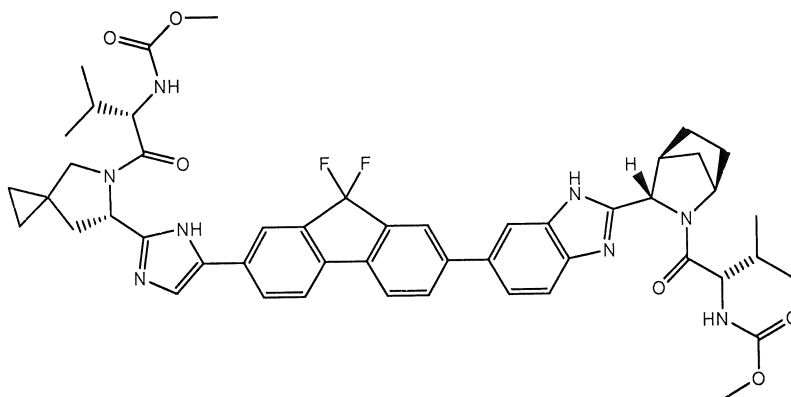
1. Viên nén chứa:

1) hợp chất 10 với lượng nằm trong khoảng từ 10 mg đến 1000 mg:



hoặc muối được dụng của nó, và

2) hợp chất 6 với lượng nằm trong khoảng từ 30 mg đến 90 mg:



hoặc muối được dụng của nó.

2. Viên nén theo điểm 1, trong đó viên nén này còn chứa một hoặc nhiều chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.