



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0025555

(51)⁷ C07H 19/06; C07H 19/24; A61K (13) B
31/7072; A61P 31/14; C07F 9/24; C07F
9/655; C07F 9/6558; C07F 9/6561;
C07H 19/04; C07H 19/044; C07H
19/052; C07H 19/10; C07H 19/207;
A61K 31/664; A61K 31/7056

-
- (21) 1-2012-03236 (22) 31/03/2011
(86) PCT/US2011/030725 31/03/2011 (87) WO/2011/123645 06/10/2011
(30) 61/319,513 31/03/2010 US; 61/319,548 31/03/2010 US; 12/783,680 20/05/2010 US
(45) 25/09/2020 390 (43) 25/04/2013 301A
(73) GILEAD PHARMASSET LLC (US)
c/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404 (US)
(72) ROSS, Bruce, S. (US); SOFIA, Michael, Joseph (US); PAMULAPATI, Ganapati,
Reddy (IN); RACHAKONDA, Suguna (IN); ZHANG, Hai-Ren (US); CHUN,
Byoung-Kwon (KR); WANG, Peiyuan (CN).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)
-

(54) HỢP CHẤT NUCLEOSIT PHOSPHORAMIDAT, DƯỢC PHẨM VÀ THUỐC CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất nucleosit phosphoramidat và chúng được dùng làm tác nhân để điều trị các bệnh do virus gây ra. Các hợp chất này là các chất ức chế sự sao chép ARN của virus phụ thuộc vào ARN và có thể được dùng làm các chất ức chế polymeraza HCV NS5A. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và thuốc chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất nucleosit phosphoramidat, dược phẩm và thuốc chứa hợp chất này. Các hợp chất này là các chất ức chế đối với sự sao chép ARN của virus phụ thuộc vào ARN và có thể được dùng làm các chất ức chế đối với HCV NS5B polymeraza, làm các chất ức chế đối với sự sao chép HCV (virus gây bệnh viêm gan C).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh nhiễm virus gây bệnh viêm gan C (Virus viêm gan C - HCV) là vấn đề sức khỏe chính dẫn đến bệnh gan mạn tính, như bệnh xơ gan và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, với tỷ lệ đáng kể trong số các cá thể bị nhiễm virus này, dự tính nằm trong khoảng từ 2 đến 15% dân số thế giới. Có khoảng 4,5 triệu người bị nhiễm virus này chỉ riêng ở Mỹ, theo Trung tâm Kiểm soát Bệnh dịch Mỹ. Theo Tổ chức Y tế Thế giới, có hơn 200 triệu người bị nhiễm virus này trên toàn thế giới, và ít nhất 3 đến 4 triệu người bị nhiễm virus này mỗi năm. Sau khi bị nhiễm virus này, khoảng 20% người loại bỏ được virus, nhưng phần còn lại có thể mang HCV suốt phần đời còn lại. Mười đến hai mươi phần trăm người bị nhiễm virus mạn tính phát triển bệnh xơ gan phá hủy gan hoặc bệnh ung thư. Bệnh do virus được truyền ngoài đường tiêu hóa do lây nhiễm qua đường máu và các sản phẩm máu, kim tiêm bị nhiễm virus, hoặc qua đường tình dục và trực tiếp từ những bà mẹ đã bị nhiễm virus hoặc truyền từ mẹ sang con. Cách điều trị hiện nay đối với bệnh nhiễm HCV, mà bị giới hạn ở cách điều trị miễn dịch bằng interferon- α tái tổ hợp riêng rẽ hoặc kết hợp với chất tương tự nucleosit ribavirin, có tác dụng lâm sàng hạn chế. Ngoài ra, hiện chưa có vacxin cho HCV. Do đó, hiện rất cần dược phẩm điều trị tốt hơn để chiến đấu một cách hữu hiệu với bệnh nhiễm HCV mạn tính.

Virion HCV là virus ARN sợi dương được bao với trình tự hệ gen oligoribonucleotit đơn gồm khoảng 9600 bazơ mã hóa polyprotein gồm khoảng 3010 axit amin. Các sản phẩm protein của gen HCV bao gồm các protein cấu trúc C, E1, và E2, và các protein phi cấu trúc NS2, NS3, NS4A và NS4B, và NS5A và NS5B. Tin rằng, các protein phi cấu trúc (NS) là bộ máy xúc tác cho sự sao chép virus. Proteaza

NS3 giải phóng NS5B, polymeraza ARN phụ thuộc ARN từ mạch polyprotein. HCV NS5B polymeraza là cần thiết để tổng hợp ARN sợi đôi từ ARN sợi đơn của virut dùng làm khuôn trong chu trình sao chép HCV. Do đó, NS5B polymeraza được xem là thành phần quan trọng trong việc sao chép phức HCV (virut gây bệnh viêm gan C) (K. Ishi, et al, Hepatology, 1999, 29:1227-1235; V. Lohmann, et al., Virology, 1998, 249:108-118). Việc ức chế HCV NS5B polymeraza ngăn cản sự hình thành của ARN của HCV sợi đôi và do đó là hướng hấp dẫn đối với việc phát triển các phương pháp điều trị bệnh nhiễm virut đặc hiệu đối với HCV.

HCV thuộc họ virut lớn có nhiều đặc điểm chung.

Virut *Flaviviridae*

Họ virut *Flaviviridae* bao gồm ít nhất ba giống khác biệt: *flavivirus*, gây bệnh ở gia súc và lợn; *flavivirus*, là nguyên nhân chính của các bệnh như bệnh sốt xuất huyết và bệnh sốt vàng; và *hepacivirus*, với thành viên duy nhất là HCV. Giống *flavivirus* bao gồm hơn 68 thành viên chia thành các nhóm trên cơ sở mối liên quan về mặt huyết thanh (Calisher et al., *J. Gen. Virol*, 1993,70,37-43). Các dấu hiệu lâm sàng thay đổi và bao gồm bệnh sốt, bệnh viêm não và bệnh sốt xuất huyết (*Fields Virology*, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). Các *flavivirus* đang được quan tâm trên thế giới liên quan đến bệnh ở người bao gồm virut gây bệnh sốt xuất huyết (dengue hemorrhagic fever - DHF), virut gây bệnh sốt vàng, virut gây hội chứng sốc và bệnh viêm não Nhật Bản (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med*, 1988, 319, 641-643).

Giống *flavivirus* bao gồm virut gây bệnh ỉa chảy do virut ở bò (bovine viral diarrhea virus - BVDV), virut gây bệnh sốt thông thường ở lợn (classical swine fever virus - CSFV, còn được gọi là virut gây bệnh tả ở lợn) và virut gây bệnh sốt biên giới (border disease virus - BDV) ở cừu (Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Hiện tượng nhiễm *flavivirus* ở gia súc đã được thuần hóa (bò, lợn và cừu) gây ra thiệt hại đáng kể về mặt kinh tế trên toàn thế giới. BVDV gây bệnh màng nhầy ở bò và điều này có ý nghĩa quan trọng đáng kể về mặt kinh tế đối với công nghiệp chăn nuôi gia súc (Meyers, G. and Thiel, H.J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118;

Moennig V., et al, *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Flavivirus ở người chưa được xác định rõ tính chất như flavivirus ở động vật. Tuy nhiên, các nghiên cứu huyết thanh học cho thấy mức độ phơi nhiễm flavivirus ở người là đáng kể.

Flavivirus và *hepacivirus* là các nhóm virus có quan hệ gần trong họ *Flaviviridae*. Các virus có quan hệ gần khác trong họ này bao gồm virus GB A, tác nhân kiểu virus GB A, virus GB B và virus GB C (còn được gọi là virus gây bệnh viêm gan G, HGV). Nhóm *hepacivirus* (virus gây bệnh viêm gan C; HCV) bao gồm nhiều virus có quan hệ gần nhưng khác biệt về kiểu hình di truyền gây nhiễm virus cho người. Có ít nhất 6 kiểu di truyền HCV và hơn 50 kiểu phụ. Do sự tương tự giữa flavivirus và *hepacivirus*, kết hợp với khả năng sinh trưởng kém của *hepacivirus* trong môi trường nuôi cấy tế bào, nên virus gây bệnh ia chảy do virus ở bò (BVDV) thường được dùng làm virus thay thế để nghiên cứu virus HCV.

Tổ chức di truyền của flavivirus và *hepacivirus* là tương tự. Các virus ARN sợi dương này chỉ có một khung đọc mở (open reading frame - ORF) rộng ghi mã tất cả các protein của virus cần thiết cho quá trình sao chép virus. Các protein này được biểu hiện như polyprotein, tức là được xử lý trong và sau khi dịch mã bởi cả proteinaza tế bào và proteinaza ghi mã virus để tạo ra protein của virus thành thực. Các protein của virus chịu trách nhiệm về sự sao chép của ARN hệ gen của virus nằm gần đầu tận cùng carboxyl. Hai phần ba của ORF được gọi là các protein phi cấu trúc (nonstructural - NS). Tổ chức di truyền và việc xử lý polyprotein của phần protein phi cấu trúc của ORF đối với flavivirus và *hepacivirus* là rất tương tự. Đối với cả flavivirus và *hepacivirus*, các protein phi cấu trúc (NS) thành thực, theo trình tự lần lượt từ đầu tận cùng amino của vùng mã hóa protein phi cấu trúc đến đầu tận cùng carboxyl của ORF, bao gồm p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, và NS5B.

Các protein NS của flavivirus và *hepacivirus* có các miền trình tự giống nhau đặc trưng của các chức năng protein cụ thể. Ví dụ, các protein NS3 của virus ở cả hai nhóm đều chứa kiểu trình tự axit amin đặc trưng của serin proteinaza và helicaza (Gorbalenya et al., *Nature*, 1988, 333, 22; Bazan and Fletterick *Virology*, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya et al., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 3889-3897). Tương tự, các protein NS5B của flavivirus và *hepacivirus* có kiểu đặc trưng của các polymeraza ARN

hướng đến ARN (Koonin, E.V. and Dolja, V.V., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 1993, 28, 375-430).

Vai trò và chức năng thực của các protein NS của flavivirus và *hepacivirus* trong chu trình sống của virus là tương tự trực tiếp. Trong cả hai trường hợp, serin proteinaza NS3 chịu trách nhiệm về toàn bộ xử lý phân giải protein đối với các tiền chất polyprotein sau vị trí của nó trong ORF (Wiskerchen and Collett, *Virology*, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager et al., *J. Virol.* 1993, 67, 3835-3844; Eckart et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993, 192, 399-406; Grakoui et al., *J. Virol.* 1993, 67, 2832-2843; Grakoui et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 10583-10587; Hijikata et al., *J. Virol.* 1993, 67, 4665-4675; Tome et al., *J. Virol.* 1993, 67, 4017-4026). Trong cả hai trường hợp, protein NS4A hoạt động như yếu tố đồng thời với serin proteaza NS3 (Bartenschlager et al., *J. Virol.* 1994, 68, 5045-5055; Failla et al., *J. Virol.* 1994, 68, 3753-3760; Xu et al., *J. Virol.*, 1997, 71 :53 12-5322). Protein NS3 của cả hai virus này có chức năng như helicaza (Kim et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, 215, 160-166; Jin and Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 323, 47-53; Warrenner and Collett, *J. Virol.* 1995, 69, 1720-1726). Cuối cùng, các protein NS5B của flavivirus và *hepacivirus* đều có hoạt tính của polymeraza ARN hướng đến ARN đã được dự đoán (Behrens et al., *EMBO*, 1996, 15, 12-22; Lechmann et al., *J. Virol.*, 1997, 71, 8416-8428; Yuan et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997, 232, 231-235; Hagedorn, công bố đơn PCT số WO 97/12033; Zhong et al., *J. Virol.*, 1998, 72, 9365-9369).

Hiện chỉ có các lựa chọn điều trị bệnh hạn chế cho các cá thể nhiễm virus gây bệnh viêm gan C. Lựa chọn điều trị bệnh hiện đang được chấp thuận là áp dụng điều trị miễn dịch bằng interferon- α tái tổ hợp riêng rẽ hoặc kết hợp với chất tương tự nucleosit ribavirin. Phương pháp điều trị bệnh này bị hạn chế ở hiệu quả lâm sàng của nó và chỉ 50% bệnh nhân được điều trị đáp ứng với phương pháp điều trị này. Do đó, rất cần có cách điều trị mới và có hiệu quả hơn để đáp ứng nhu cầu y tế chưa được thỏa mãn do bệnh nhiễm HCV.

Nhiều đích phân tử tiềm năng để phát triển thuốc có tác dụng chống virus trực tiếp làm liệu pháp chống HCV đã được xác định bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, autoproteaza NS2-NS3, proteaza NS3, helicaza NS3 và polymeraza NS5B. Polymeraza

ARN phụ thuộc ARN là vô cùng cần thiết cho việc sao chép hệ gen ARN sợi đơn chiều dương và enzym này đã thu hút sự quan tâm đáng kể từ phía các nhà nghiên cứu hóa y.

Để làm thuốc điều trị tiềm năng đối với bệnh nhiễm HCV, các chất ức chế HCV NS5B đã được xem xét: Tan, S.-L., et al., *Nature Rev. Drug Discov.*, 2002, 1, 867-881; Walker, M.P. et al., *Exp. Opin. Investigational Drugs*, 2003, 12, 1269-1280; Ni, Z.-J., et al., *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2004, 7, 446-459; Beaulieu, P. L., et al., *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2004, 5, 838-850; Wu, J., et al., *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2003, 3, 207-219; Griffith, R.C., et al., *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 2004, 39, 223-237; Carrol, S., et al., *Infectious Disorders-Drug Targets*, 2006, 6, 17-29. Khả năng xuất hiện các chủng HCV kháng và nhu cầu xác định các tác nhân có phổ kiểu di truyền rộng khuyến khích những nỗ lực không ngừng trong việc xác định các nucleosit mới và có hiệu quả hơn làm chất ức chế HCV NS5B.

Các chất ức chế nucleosit đối với NS5B polymeraza có thể hoạt động như cơ chất phi tự nhiên mà kết thúc chuỗi hoặc như chất ức chế cạnh tranh mà cạnh tranh với nucleotit liên kết với polymeraza. Để thực hiện chức năng của yếu tố kết thúc chuỗi, chất tương tự nucleosit phải được đưa vào trong tế bào và chuyển hóa *in vivo* thành triphosphat để cạnh tranh vị trí liên kết nucleotit của polymeraza. Sự chuyển hóa thành triphosphat này thường được thực hiện nhờ các kinaza của tế bào mà đặt ra thêm các yêu cầu về mặt cấu trúc đối với chất ức chế nucleosit polymeraza tiềm năng. Tuy nhiên, điều này giới hạn việc đánh giá trực tiếp các nucleosit làm các chất ức chế sự sao chép HCV ở các thử nghiệm trên cơ sở tế bào có khả năng phosphoryl hóa tại chỗ.

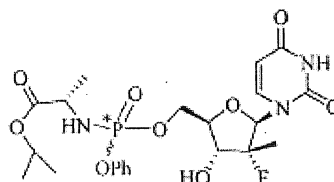
Trong một số trường hợp, hoạt tính sinh học của nucleosit bị cản trở bởi các đặc tính cơ chất kém của nó đối với một hoặc nhiều kinaza cần thiết để chuyển hóa nó thành dạng triphosphat hoạt tính. Sự tạo ra monophosphat nhờ nucleosit kinaza thường được xem là bước hạn chế tốc độ trong ba lần phosphoryl hóa. Để bỏ qua nhu cầu về bước phosphoryl hóa ban đầu trong quá trình chuyển hóa nucleosit thành chất tương tự triphosphat hoạt tính, việc điều chế tiền dược chất phosphat bền vững đã được thông báo. Các tiền dược chất nucleosit phosphoramidat đã thể hiện là các tiền chất của nucleosit triphosphat hoạt tính và ức chế sự sao chép virut khi được dùng cho các tế

bào nguyên vẹn nhiễm virus (McGuigan, C, et al., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., et al., *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., et al., *Proc. National Acad Sci USA*, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, A. Q., et al., *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, E. J., et al., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001, 20, 1091-1098; Lee, W.A., et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49, 1898); công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2006/0241064; và WO 2007/095269.

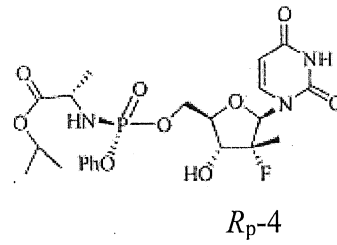
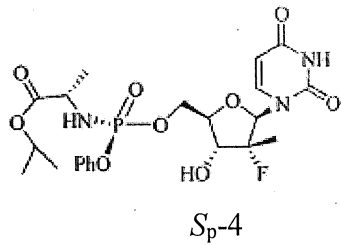
Các tính chất hóa lý và dược động học kém của các nucleosit đôi khi cũng hạn chế việc sử dụng chúng làm dược chất điều trị chính. Các đặc tính kém này có thể hạn chế mức độ hấp thu dược phẩm ở ruột và hạn chế mức độ hấp thu vào tế bào hoặc mô đích. Các tiền dược chất của nucleosit đã được sử dụng để cải thiện các tính chất của chúng. Đã thấy rằng việc điều chế các nucleosit phosphoramidat nâng cao mức độ hấp thu nucleosit qua đường nội hấp và hơn thế nữa, gốc phosphoramidat của các "tiền nucleotit" này được giấu bằng nhóm ưa chất béo trung tính để đạt được hệ số phân chia thích hợp nhằm tối ưu hóa sự hấp thu và vận chuyển vào tế bào làm tăng đáng kể nồng độ nội bào của chất tương tự nucleosit monophosphat so với cách chỉ dùng riêng nucleosit gốc. Sự thủy phân gốc phosphat este nhờ enzym tạo ra nucleosit monophosphat, trong đó bước phosphoryl hóa ban đầu hạn chế tốc độ là không cần thiết. Để đạt được mục đích này, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 12/053,015, tương ứng với WO 2008/121634 và US 2010/0016251, đã bộc lộ nhiều tiền dược chất phosphoramidat nucleosit, nhiều hợp chất trong số này thể hiện hoạt tính trong thử nghiệm HCV. Một vài hợp chất được bộc lộ trong US 2010/0016251 đã được thử nghiệm làm các ứng viên lâm sàng tiềm năng để đề nghị Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration –FDA) cấp phép sử dụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 4 và các chất đồng phân không đối quang tương ứng trên cơ sở phospho của nó có công thức S_p-4 và R_p-4 .



4



Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là nhiễu xạ đồ XRD (gây nhiễu xạ bằng tia X - X Ray Diffraction) có độ phân giải cao của hợp chất có công thức 4.

Hình 2 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức R_p-4 .

Hình 3 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 1).

Hình 4 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 1).

Hình 5 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (dạng 2).

Hình 6 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức $S_p-4 \cdot CHCl_3$ (dạng 3).

Hình 7 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 4).

Hình 8 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 5).

Hình 9 là nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức S_p-4 (vô định hình).

Hình 10 là sơ đồ cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 1)

Hình 11 là sơ đồ cấu trúc tinh thể (đẳng hướng) chụp bằng tia X của hợp chất có công thức $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (dạng 2)

Hình 12 là sơ đồ cấu trúc tinh thể (không đẳng hướng) chụp bằng tia X của hợp chất có công thức $S_p-4 \cdot CH_2Cl_2$ (dạng 2)

Hình 13 là sơ đồ cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất có công thức $S_p-4.CHCl_3$ (dạng 3)

Hình 14 là phổ FT-IR (phổ biến đổi Fourier chụp bằng tia tử ngoại - Fourier Transform Infrared spectoscopy) của hợp chất có công thức 4.

Hình 15 là phổ FT-IR của hợp chất có công thức R_p-4 .

Hình 16 là phổ FT-IR của hợp chất có công thức S_p-4 .

Hình 17. Phân tích TGA (Thermal Gravimetrical Analysis) và DSC (Đo nhiệt lượng quét vi phân) của hợp chất có công thức 4.

Hình 18. Phân tích TGA và DSC của hợp chất có công thức R_p-4 .

Hình 19. Phân tích TGA và DSC của hợp chất có công thức S_p-4 .

Hình 20A. Cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất có công thức 8 (chất đồng phân S_p) (phân tử số 1 của đơn vị không đối xứng).

Hình 20B. Cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất có công thức 8 (chất đồng phân S_p) (phân tử số 2 của đơn vị không đối xứng).

Hình 21. Nhiễu xạ đồ XRD có độ phân giải cao của hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 6).

Hình 22A. Cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat (phân tử số 1 của đơn vị không đối xứng).

Hình 22B. Cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat (phân tử số 2 của đơn vị không đối xứng).

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Quán từ "một" thực thể được sử dụng trong bản mô tả này chỉ một hoặc nhiều thực thể đó; ví dụ, một hợp chất chỉ một hoặc nhiều hợp chất hoặc ít nhất một hợp chất. Như vậy, thuật ngữ "một", "một hoặc nhiều" và "ít nhất một" có thể được sử dụng thay thế nhau.

Thuật ngữ "một cách tùy ý" hoặc "tùy ý" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ sự kiện và sự việc được mô tả tiếp theo có thể nhưng không nhất thiết xảy ra, và bản mô tả này bao gồm các ví dụ xảy ra sự kiện và sự việc đó và cả các ví dụ không xảy ra.

Ví dụ, "liên kết tùy ý" có nghĩa là liên kết có thể có mặt hoặc không có mặt, và bản mô tả này bao gồm các liên kết đơn, liên kết đôi, hoặc liên kết ba.

Thuật ngữ "P*" có nghĩa rằng nguyên tử phospho là không đối xứng và nó có tên gọi theo Cahn-Ingold-Prelog tương ứng là "R" hoặc "S" mà có nghĩa đơn giản đã được chấp nhận.

Thuật ngữ "đã được tinh chế" được dùng trong bản mô tả này chỉ độ tinh khiết của hợp chất nhất định. Ví dụ, một hợp chất "đã được tinh chế" khi hợp chất đó là thành phần chính của chế phẩm, tức là ít nhất 50% trọng lượng tinh khiết. Do đó, thuật ngữ "đã được tinh chế" bao hàm độ tinh khiết ít nhất 50% trọng lượng, độ tinh khiết ít nhất 60% trọng lượng, độ tinh khiết ít nhất 70%, độ tinh khiết ít nhất 80%, độ tinh khiết ít nhất 85%, độ tinh khiết ít nhất 90%, độ tinh khiết ít nhất 92%, độ tinh khiết ít nhất 94%, độ tinh khiết ít nhất 96%, độ tinh khiết ít nhất 97%, độ tinh khiết ít nhất 98%, độ tinh khiết ít nhất 99%, độ tinh khiết ít nhất 99,5%, và độ tinh khiết ít nhất 99,9%, trong đó thuật ngữ "hầu như tinh khiết" bao hàm độ tinh khiết ít nhất 97%, độ tinh khiết ít nhất 98%, độ tinh khiết ít nhất 99%, độ tinh khiết ít nhất 99,5%, và độ tinh khiết ít nhất 99,9%.

Thuật ngữ "chất chuyển hóa" được dùng trong bản mô tả này chỉ hợp chất được tạo ra *in vivo* sau khi cho đối tượng có nhu cầu dùng.

Thuật ngữ "khoảng" (còn được thể hiện bằng ~) có nghĩa là trị số bằng số đã nêu nằm trong khoảng thay đổi trong phạm vi sai số thí nghiệm chuẩn.

Thuật ngữ "về cơ bản như được thể hiện trên..." mẫu XRPD nhất định có nghĩa là các vị trí pic thể hiện trên mẫu XRPD đó cơ bản là giống nhau, trong phạm vi xem xét bằng mắt thường hoặc phải viện đến danh mục pic được chọn ($\pm 0,2^\circ 2\theta$). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng cường độ có thể thay đổi tùy theo mẫu.

Thuật ngữ "hầu như khan" có nghĩa là chất chứa nhiều nhất 10% trọng lượng nước, tốt hơn là chứa nhiều nhất 1% trọng lượng nước, tốt hơn nữa là chứa nhiều nhất 0,5% trọng lượng nước, và tốt nhất là chứa nhiều nhất 0,1% trọng lượng nước.

Dung môi hoặc kháng dung môi (như được sử dụng trong các phản ứng, bước kết tinh, v.v. hoặc mạng và/hoặc các dung môi hấp thụ) bao gồm ít nhất một trong số các rượu có 1 đến 8 nguyên tử cacbon, ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, keton có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, clocacbon có 1 đến 2

nguyên tử cacbon, nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon, dung môi hỗn hợp, hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon thơm có 6 đến 12 nguyên tử cacbon.

Thuật ngữ rượu có 1 đến 8 nguyên tử cacbon chỉ rượu mạch thẳng/mạch nhánh và/hoặc mạch vòng/không vòng có số nguyên tử cacbon như vậy. Rượu có 1 đến 8 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, isobutanol, hexanol, và xyclohexanol.

Thuật ngữ ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon chỉ ete mạch thẳng/mạch nhánh và/hoặc mạch vòng/không vòng có số nguyên tử cacbon như vậy. Ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dimetyl ete, dietyl ete, diisopropyl ete, di-n-butyl ete, metyl-t-butyl ete (MTBE), tetrahydrofuran, và dioxan.

Thuật ngữ keton có 3 đến 7 nguyên tử cacbon chỉ keton mạch thẳng/mạch nhánh và/hoặc mạch vòng/không vòng có số nguyên tử cacbon như vậy. Keton có 3 đến 7 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axeton, metyl etyl keton, propanon, butanon, metyl isobutyl keton, metyl butyl keton, và xyclohexanon.

Thuật ngữ este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon chỉ este mạch thẳng/mạch nhánh và/hoặc mạch vòng/không vòng có số nguyên tử cacbon như vậy. Este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etyl axetat, propyl axetat, n-butyl axetat, v.v..

Thuật ngữ clocacbon có 1 đến 2 nguyên tử cacbon chỉ clocacbon có số nguyên tử cacbon như vậy. Clocacbon có 1 đến 2 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, clorofom, metylen clorua (DCM), cacbon tetraclorea, 1,2-dicloetan, và tetracloetan.

Thuật ngữ nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon chỉ nitril có số nguyên tử cacbon như vậy. Nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axetonitril, propionitril, v.v..

Thuật ngữ dung môi hỗn hợp chỉ dung môi thường được sử dụng trong hóa học hữu cơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dietylen glycol, diglyme (dietylen glycol dimetyl ete), 1,2-dimetoxy-etan, dimetylformamit, dimetylsulfoxit, etylen glycol, glyxerin, hexametylphosphoramit, hexametylphospho triamide, N-metyl-2-pyrrolidinon, nitrometan, pyridin, trietyl amin, và axit axetic.

Thuật ngữ hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon chỉ hydrocacbon mạch thẳng/mạch nhánh và/hoặc mạch vòng/không vòng. Hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, n-pentan, ete dầu mỏ (dầu hỏa), n-hexan, n-heptan, xyclohexan, và xycloheptan.

Thuật ngữ hydrocacbon thơm có 6 đến 12 nguyên tử cacbon được dùng chỉ hydrocacbon được thế và hydrocacbon không được thế có khung chính là nhóm phenyl. Các hydrocacbon được ưu tiên bao gồm benzen, xylen, toluen, clobenzen, o-xylen, m-xylen, p-xylen, xylen, trong đó toluen được ưu tiên hơn.

Thuật ngữ "halo" hoặc "halogen" được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm clo, bromo, iodo và flo.

Thuật ngữ "nhóm che khuất" chỉ nhóm hóa học có các đặc tính sau. "Nhóm" này thu được từ "hợp chất bảo vệ". Các nhóm mà chọn lọc đối với các hydroxyl bậc một hơn so với hydroxyl bậc hai mà có thể được dùng đến trong các điều kiện phù hợp với tính ổn định của phosphoramidat (độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 8) và mang lại cho sản phẩm thu được các tính chất vật lý cơ bản khác cho phép dễ tách hơn sản phẩm chứa 3'-phosphoramidat-5'-nhóm mới ra khỏi hợp chất mong muốn chưa phản ứng. Nhóm này phải phản ứng một cách chọn lọc với hiệu suất tốt để tạo ra cơ chất được bảo vệ mà là bền đối với các phản ứng dự kiến (xem: *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1999). Ví dụ về nhóm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, benzoyl, axetyl, benzoyl được thế phenyl, tetrahydropyranyl, trityl, DMT (4,4'-dimetoxytrityl), MMT (4-monometoxytrityl), trimetoxytrityl, nhóm pixyl (9-phenylxanthen-9-yl), thiopixyl (9-phenylthioxanthen-9-yl) hoặc 9-(p-metoxyphenyl)xanthin-9-yl (MOX), v.v.; C(O)-alkyl, C(O)Ph, C(O)aryl, CH₂O-alkyl, CH₂O-aryl, SO₂-alkyl, SO₂-aryl, *tert*-butyldimetylsilyl, *tert*-butyldiphenylsilyl. Các axetal, như MOM hoặc THP và nhóm tương tự, được xem là các nhóm có thể. Các hợp chất được flo hóa cũng được dự tính đến chừng nào chúng có thể được gắn vào hợp chất và có thể được loại bỏ một cách chọn lọc bằng cách cho qua môi trường chiết pha rắn chứa flo (FloFlash®). Ví dụ cụ thể bao gồm chất tương tự trityl được flo hóa, chất tương tự trityl 1-[4-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perflodexyl)phenyl]-1,1-diphenylmetanol. Các chất tương tự trityl khác được flo hóa, BOC, FMOC, CBz, v.v. cũng được dự tính. Sulfonyl clorua như p-toluensulfonyl

clorua có thể phản ứng một cách chọn lọc ở vị trí 5'. Este có thể được tạo ra một cách chọn lọc như axetat và benzoat. Anhydrit dicarboxylic như anhydrit succinic và các chất dẫn xuất của nó có thể được sử dụng để tạo ra liên kết este với axit carboxylic tự do, các ví dụ như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, oxalyl, malonyl, succinyl, glutaryl, adipyl, pimelyl, superyl, azelayl, sebacyl, phtalyl, isophtalyl, terephthalyl, v.v. Axit carboxylic tự do làm tăng độ phân cực một cách đáng kể và cũng có thể được sử dụng làm cơ sở để chiết sản phẩm của phản ứng vào các pha trong nước có độ kiềm nhẹ như dung dịch natri bicacbonat. Nhóm phosphoramidat là tương đối ổn định trong môi trường axit, nên các nhóm cần đến điều kiện phản ứng axit, như tetrahydropyranyl, cũng có thể được sử dụng.

Thuật ngữ "nhóm bảo vệ" thu được từ "hợp chất bảo vệ", có nghĩa đơn giản thông thường, tức là ít nhất một nhóm bảo vệ hoặc nhóm che khuất liên kết với ít nhất một nhóm chức (ví dụ, -OH, -NH₂, v.v.) mà cho phép biến đổi hóa học đối với ít nhất một nhóm chức khác. Ví dụ về nhóm bảo vệ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở; benzoyl, axetyl, benzoyl được thế bằng phenyl, tetrahydropyranyl, trityl, DMT (4,4'-dimetoxytrityl), MMT (4-monometoxytrityl), trimetoxytrityl, nhóm pixyl (9-phenylxanthan-9-yl), thiopixyl (9-phenylthioxanthen-9-yl) hoặc 9-(p-metoxyphenyl)xanthin-9-yl (MOX), v.v.; C(O)-alkyl, C(O)Ph, C(O)aryl, C(O)O(alkyl thấp), C(O)O(alkylen thấp)aryl (ví dụ, -C(O)OCH₂Ph), C(O)O-aryl, CH₂O-alkyl, CH₂O-aryl, SO₂-alkyl, SO₂-aryl, nhóm bảo vệ chứa ít nhất một nguyên tử silic, như *tert*-butyldimetylsilyl, *tert*-butyldiphenylsilyl, Si(alkyl thấp)₂OSi(alkyl thấp)₂OH (như -Si(^tPr)₂OSi(^tPr)₂OH).

Thuật ngữ "hợp chất bảo vệ" được sử dụng trong bản mô tả này và trừ khi có quy định khác chỉ hợp chất chứa "nhóm bảo vệ" và có khả năng phản ứng với hợp chất chứa nhóm chức có khả năng được bảo vệ.

Thuật ngữ "nhóm rời chuyển" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết (*Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure* - Fourth Edition by Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992 pages 351-357) và là nhóm cấu thành một phần và được gắn vào phân tử cơ chất; trong phản ứng khi phân tử cơ chất tham gia vào phản ứng thế (ví dụ, với một ái nhân), thì nhóm rời chuyển được thế. Ví dụ về nhóm rời chuyển bao gồm, nhưng không chỉ

giới hạn ở, halogen (F, Cl, Br, và I), tốt hơn là Cl, Br, hoặc I; tosylat, mesylat, triflat, axetat, camphorsulfonat, aryloxit, và aryloxit được thế bằng ít nhất một nhóm rút điện tử (ví dụ, p-nitrophenoxit, 2-clophenoxit, 4-clophenoxit, 2,4-dinitrophenoxit, pentafluorophenoxit, v.v.), v.v.. Thuật ngữ "nhóm rút điện tử" được dùng trong bản mô tả này với nghĩa thông thường của nó. Ví dụ về nhóm rút điện tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, halogen, $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{alkyl thấp})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{aryl})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{alkyl thấp})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{aryl})$, v.v..

Thuật ngữ "thuốc thử bazơ" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất có khả năng tách proton ra khỏi nhóm hydroxyl. Ví dụ về thuốc thử bazơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (alk)oxit thấp ((alkyl thấp)OM) kết hợp với dung môi là rượu, trong đó (alk)oxit thấp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, MeO^- , EtO^- , ${}^n\text{PrO}^-$, ${}^i\text{PrO}^-$, ${}^t\text{BuO}^-$, ${}^i\text{AmO}^-$ (iso-amyloxit), v.v., và trong đó M là cation kim loại kiềm, như Li^+ , Na^+ , K^+ , v.v.. Các dung môi là rượu bao gồm (alkyl thấp)OH, ví dụ, MeOH, EtOH, ${}^n\text{PrOH}$, ${}^i\text{PrOH}$, ${}^t\text{BuOH}$, ${}^i\text{AmOH}$, v.v.. Bazơ không phải là alkoxy cũng có thể được sử dụng như natri hydrua, natri hexametyldisilazan, lithi hexametyldisilazan, lithi diisopropylamin, canxi hydrua, natri cacbonat, kali cacbonat, xezi cacbonat, DBU, DBN, các chất phản ứng Grignard, như (alkyl thấp)Mg(halogen), mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, MeMgCl, MeMgBr, ${}^t\text{BuMgCl}$, ${}^t\text{BuMgBr}$, v.v..

Thuật ngữ "bazơ" bao hàm thuật ngữ "thuốc thử bazơ" và có nghĩa là hợp chất có khả năng tách proton ra khỏi hợp chất chứa proton, tức là, bazơ. Ngoài các ví dụ nêu trên, ví dụ khác nữa về bazơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pyridin, colidin, 2,6-(alkyl thấp)-pyridin, dimetyl-anilin, imidazol, N-metyl-imidazol, pyrazol, N-metyl-pyrazol, trietylamin, di-isopropyletylamin, v.v..

Thuật ngữ "bazơ không ái nhân" có nghĩa là hợp chất có khả năng hoạt động như bazơ, nhưng có mức độ ái nhân thấp. Ví dụ về bazơ không ái nhân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kali cacbonat, xezi cacbonat, di-isopropylamin, di-isopropyletylamin, trietylamin, quinuclidin, naphthalen-1,8-diamin, 2,2,6,6-tetrametylpiperidin, 1,8-diazabicycloundec-7-en, 4-dimetylamino-pyridin, pyridin, 2,6-di- C_{1-6} -alkyl-pyridin, 2,4,6-tri- C_{1-6} -alkyl-pyridin, 1,5-diazabicyclo[4,3,0]non-5-en, và 1,4-diazabicyclo [2,2,2]octan.

Thuật ngữ "nhóm rút điện tử" được dùng với nghĩa thông thường của nó. Ví dụ về nhóm rút điện tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, halogen (F, Cl, Br, hoặc I), $-\text{NO}_2$, $-\text{C}(\text{O})(\text{alkyl thấp})$, $-\text{C}(\text{O})(\text{aryl})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{alkyl thấp})$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{aryl})$, v.v..

Thuật ngữ "hợp chất dạng đồng tinh thể" bao gồm hợp chất dạng đồng tinh thể của các hợp chất có công thức R_p-4 , hoặc S_p-4 kết hợp với các muối, kể cả các muối được dùng.

Thuật ngữ "muối" được dùng trong bản mô tả này chỉ hợp chất chứa cation và anion, có thể được tạo ra bằng cách thêm proton đối với gốc nhận proton và/hoặc loại bỏ proton đối với gốc cho proton. Cần phải lưu ý rằng việc thêm proton đối với gốc nhận proton tạo ra các loại cation trong đó điện tích được cân bằng nhờ sự có mặt của anion sinh lý, trong đó việc loại bỏ proton đối với gốc cho proton tạo ra các loại anion trong đó điện tích được cân bằng nhờ sự có mặt của cation sinh lý.

Thuật ngữ "muối được dùng" có nghĩa là muối chấp nhận được về mặt dược lý. Ví dụ về muối được dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (1) các muối cộng axit, được tạo ra với các axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và axit tương tự; hoặc được tạo ra với các axit hữu cơ như axit glycolic, axit pyruvic, axit lactic, axit malonic, axit malic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit xitric, axit 3-(4-hydroxybenzoyl)benzoic, axit xinamic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit 1,2-etan-disulfonic, axit 2-hydroxyetansulfonic, axit benzensulfonic, axit 4-clobenzensulfonic, axit 2-naphtalensulfonic, axit 4-toluensulfonic, axit camphorsulfonic, axit lauryl sulfuric, axit gluconic, axit glutamic, axit salixylic, axit muconic, và axit tương tự, hoặc (2) các muối cộng bazơ được tạo ra với bazơ liên hợp của axit bất kỳ trong số các axit vô cơ nêu trên, trong đó bazơ liên hợp chứa thành phần cation được chọn trong số Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_gR^{g+} , trong đó R^{g+} là C_{1-3} alkyl và g là số được chọn trong số 0, 1, 2, 3, hoặc 4. Cần phải hiểu rằng tất cả các viện dẫn đến muối được dùng đều bao gồm dung môi các dạng cộng (solvat) hoặc các dạng tinh thể (chất đa hình) như được bộc lộ trong bản mô tả này, của chính muối cộng axit đó.

Thuật ngữ "alkyl" chỉ gốc hydrocarbon mạch nhánh hoặc mạch không nhánh, no, hóa trị một chứa 1 đến 30 nguyên tử cacbon. Thuật ngữ " C_{1-M} alkyl" chỉ alkyl chứa 1 đến M nguyên tử cacbon, trong đó M là một số nguyên có các trị số sau: 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30. Thuật ngữ "C₁₋₄ alkyl" chỉ alkyl chứa 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Thuật ngữ "alkyl thấp" chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa 1 đến 6 nguyên tử cacbon. "C₁₋₂₀ alkyl" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ alkyl chứa 1 đến 20 nguyên tử cacbon. "C₁₋₁₀ alkyl" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ alkyl chứa 1 đến 10 nguyên tử cacbon. Ví dụ về các nhóm alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm alkyl thấp bao gồm metyl, etyl, propyl, *i*-propyl, *n*-butyl, *i*-butyl, *t*-butyl hoặc pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, heptyl, và octyl. Thuật ngữ (ar)alkyl hoặc (heteroaryl)alkyl chỉ nhóm alkyl tùy ý được thế lần lượt bằng aryl hoặc nhóm heteroaryl.

Thuật ngữ "alkenyl" chỉ gốc mạch hydrocacbon không được thế có 2 đến 10 nguyên tử cacbon có một hoặc hai liên kết đôi olefin, tốt hơn là có một liên kết đôi olefin. Thuật ngữ "C_{2-N} alkenyl" chỉ alkenyl chứa 2 đến N nguyên tử cacbon, trong đó N là một số nguyên có các trị số sau: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10. Thuật ngữ "C₂₋₁₀ alkenyl" chỉ alkenyl chứa 2 đến 10 nguyên tử cacbon. Thuật ngữ "C₂₋₄ alkenyl" chỉ alkenyl chứa 2 đến 4 nguyên tử cacbon. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vinyl, 1-propenyl, 2-propenyl (allyl) hoặc 2-butenyl (crotyl).

Thuật ngữ "aryl" được sử dụng trong bản mô tả này, và trừ khi có quy định khác, chỉ phenyl được thế hoặc không được thế (Ph), biphenyl, hoặc naphthyl, tốt hơn là thuật ngữ aryl chỉ phenyl được thế hoặc không được thế. Nhóm aryl có thể được thế bằng một hoặc nhiều gốc được chọn trong số hydroxyl, F, Cl, Br, I, amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, xyano, axit sulfonic, sulfat, axit phosphonic, phosphat, và phosphonat, dù không được bảo vệ, hoặc được bảo vệ, nếu cần, như chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, như được bộc lộ trong ấn phẩm: T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "*Protective Groups in Organic Synthesis*," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

Thuật ngữ "aryloxit" được sử dụng trong bản mô tả này, và trừ khi có quy định khác, chỉ phenoxit được thế hoặc không được thế (PhO-), *p*-phenyl-phenoxit (*p*-Ph-PhO-), hoặc naphtoxít, tốt hơn là thuật ngữ aryloxit được dùng chỉ phenoxit được thế hoặc không được thế. Nhóm aryloxit có thể được thế bằng một hoặc nhiều gốc được chọn trong số hydroxyl, F, Cl, Br, I, -C(O)(alkyl thấp), -C(O)O(alkyl thấp), amino, alkylamino, arylamino, alkoxy, aryloxy, nitro, xyano, axit sulfonic, sulfat, axit

phosphonic, phosphat, và phosphonat, dù không được bảo vệ, hoặc được bảo vệ, nếu cần, như chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, như được bộc lộ trong ấn phẩm: T.W. Greene and P.G. M. Wuts, "*Protective Groups in Organic Synthesis*," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999.

Thuật ngữ "chế phẩm" hoặc "dạng liều" nhằm bao gồm cả chế phẩm dạng rắn và chế phẩm dạng lỏng chứa hoạt chất và chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng hoạt chất có thể tồn tại trong các chế phẩm khác nhau tùy theo liều lượng mong muốn và các thông số dược động học mong muốn.

Thuật ngữ "tá dược" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ hợp chất mà được sử dụng để bào chế dược phẩm, và thường là an toàn, không độc và không gây trở ngại về mặt sinh học hoặc theo cách nào khác, và bao gồm các tá dược mà được chấp nhận để dùng trong thú y cũng như dùng làm dược phẩm cho người.

Thuật ngữ "tinh thể" chỉ trạng thái khi mẫu rắn của hợp chất có công thức S_p-4 hoặc hợp chất có công thức R_p-4 có các tính chất tinh thể khi được xác định theo phân tích nhiễu xạ bột bằng tia X hoặc kỹ thuật dùng tia X tinh thể đơn.

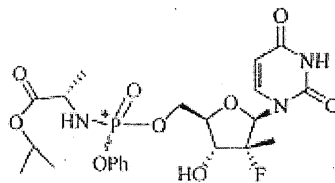
Thuật ngữ "kiểu tinh thể" chỉ trạng thái khi mẫu rắn của hợp chất có công thức S_p-4 hoặc hợp chất có công thức R_p-4 có các tính chất tinh thể khi được xác định theo một cách, ví dụ, bằng cách quan sát bằng mắt thường hoặc bằng cách dùng kính hiển vi quang học hoặc kính hiển vi phân cực, nhưng không có các đặc tính tinh thể khi được xác định theo cách khác, ví dụ, phân tích nhiễu xạ bột bằng tia X.

Các phương pháp quan sát bằng mắt thường để xác định độ kết tinh của mẫu rắn bằng cách quan sát bằng mắt thường hoặc bằng cách dùng kính hiển vi quang học hoặc kính hiển vi phân cực đã được bộc lộ trong USP <695> và <776>, cả hai tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Mẫu rắn của hợp chất có công thức S_p-4 hoặc hợp chất có công thức R_p-4 mà là "kiểu tinh thể" có thể ở dạng tinh thể trong các điều kiện nhất định nhưng có thể không ở dạng tinh thể trong các điều kiện khác.

Thuật ngữ "vô định hình" chỉ trạng thái khi mẫu rắn của hợp chất có công thức S_p-4 hoặc hợp chất có công thức R_p-4 không ở dạng tinh thể hay kiểu tinh thể.

Các phương án thực hiện

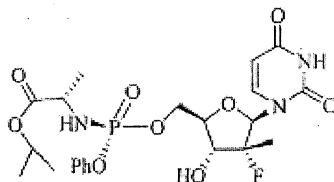
Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 4:



4

trong đó P* là nguyên tử phospho không đối xứng. Do nguyên tử phospho không đối xứng, nên hợp chất có công thức 4 có hai chất đồng phân không đối quang được ký hiệu là R_p -4 và S_p -4. Hợp chất có công thức 4 có thể là một phần của solvat, hydrat, hoặc hỗn hợp solvat/hydrat. Solvat này được ký hiệu là 4.nS, trong khi hydrat được ký hiệu là 4.mH₂O, trong đó S là dung môi mạng tinh thể, n thay đổi theo số nguyên hoặc lượng không là số nguyên từ 0 đến 3 và m thay đổi theo số nguyên hoặc lượng không là số nguyên từ 0 đến 5. Cuối cùng, hợp chất có công thức 4 có thể không tồn tại ở dạng solvat hoặc hydrat, nhưng có lượng có lợi của dung môi (S) hoặc nước được hấp thụ. Trong trường hợp đó, lượng S hoặc nước có thể thay đổi từ 0% trọng lượng đến 10% trọng lượng tính theo trọng lượng của hợp chất có công thức 4. Hợp chất có công thức 4 và solvat và hydrat của nó ở dạng tinh thể, kiểu tinh thể, hoặc vô định hình.

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p -4.

 R_p -4

Hợp chất có công thức R_p -4 có thể là một phần của solvat, hydrat, hoặc hỗn hợp solvat/hydrat. Solvat được ký hiệu là R_p -4.nS, trong khi hydrat được ký hiệu là S_p -4.mH₂O, trong đó S là dung môi mạng tinh thể, n thay đổi theo số nguyên hoặc lượng không là số nguyên từ 0 đến 3 và m thay đổi theo số nguyên hoặc lượng không là số nguyên từ 0 đến 5. Cuối cùng, hợp chất có công thức R_p -4 có thể không tồn tại ở dạng solvat, hydrat, hoặc hỗn hợp solvat/hydrat, nhưng có lượng có lợi của dung môi (S) đã hấp thụ, nước, hoặc cả S và nước. Trong trường hợp đó, lượng S hoặc nước có thể thay đổi từ 0% trọng lượng đến 10% trọng lượng tính theo trọng lượng của hợp chất có công thức R_p -4. Hợp chất có công thức R_p -4 và solvat và hydrat của nó ở dạng tinh thể, kiểu tinh thể, hoặc vô định hình.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 ở dạng tinh thể.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD (nhiều xạ bột tia X - X Ray powder diffraction) ($^\circ$) ở khoảng: 6,6, 7,1, 9,0, 11,6, 17,9, 20,7, 24,1, 24,4, và 26,2.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD ($^\circ$) ở khoảng: 6,6, 7,1, 9,0, 11,0, 11,6, 12,0, 16,0, 17,9, 19,6, 20,7, 21,0, 21,7, 21,9, 22,2, 23,1, 24,1, 24,4, 26,1, 27,3, 27,7, và 28,2.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 ở dạng tinh thể có mẫu nhiễu xạ XRPD về cơ bản như được thể hiện trên hình 2.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 có các pic FT-IR sau (cm^{-1}): 1742, 1713, 1679, 1460, 1377, 1259, 1157, và 1079.

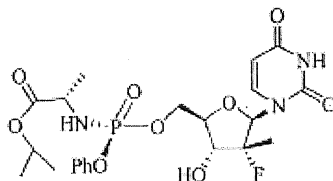
Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 có phổ FT-IR về cơ bản như thể hiện trên hình 15.

Theo khía cạnh thứ bảy của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất hầu như tinh khiết có công thức R_p-4 .

Theo khía cạnh thứ tám của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 ở dạng tinh thể hầu như tinh khiết.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức R_p-4 ở dạng vô định hình hầu như tinh khiết.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 :



S_p-4

Hợp chất có công thức S_p-4 có thể là một phần của solvat, hydrat, hoặc hỗn hợp solvat/hydrat. Solvat được ký hiệu là $S_p-4.nS$, trong khi hydrat được ký hiệu là S_p-

4.mH₂O, trong đó S là dung môi mạng tinh thể, n thay đổi là số nguyên hoặc lượng không là số nguyên từ 0 đến 3 và m thay đổi là số nguyên hoặc lượng không là số nguyên từ 0 đến 5. Cuối cùng, hợp chất có công thức S_p-4 có thể không tồn tại ở dạng solvat hoặc hydrat, nhưng có lượng có lợi của dung môi (S) hoặc nước được hấp thụ. Trong trường hợp đó, lượng S hoặc nước có thể thay đổi từ 0% trọng lượng đến 10% trọng lượng tính theo trọng lượng của hợp chất có công thức S_p-4. Hợp chất có công thức S_p-4 và solvat và hydrat của nó ở dạng tinh thể, kiểu tinh thể, hoặc vô định hình.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể đơn tà, tốt hơn là có các thông số tế bào đơn vị sau: a ~ 12,88Å, b ~ 6,17Å, c ~ 17,73Å, và β ~ 92,05°.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể đơn tà, tốt hơn là có các thông số tế bào đơn vị sau: a ~ 20,09Å, b ~ 6,10Å, c ~ 23,01Å, và β ~ 112,29°.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể đơn tà, tốt hơn là có các thông số tế bào đơn vị sau: a ~ 12,83Å, b ~ 6,15Å, c ~ 17,63Å, và β ~ 91,75°.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể đơn tà, tốt hơn là có các thông số tế bào đơn vị sau: a ~ 12,93Å, b ~ 6,18Å, c ~ 18,01Å, và β ~ 96,40°.

Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD (°) ở khoảng: 5,2, 7,5, 9,6, 16,7, 18,3, 22,2.

Theo khía cạnh thứ bảy của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD (°) ở khoảng: 5,0, 7,3, 9,4, và 18,1.

Theo khía cạnh thứ tám của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD (°) ở khoảng: 4,9, 6,9, 9,8, 19,8, 20,6, 24,7, và 26,1.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD ($^\circ$) ở khoảng: 6,9, 9,8, 19,7, 20,6, và 24,6.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD ($^\circ$) ở khoảng: 5,0, 6,8, 19,9, 20,6, 20,9, và 24,9.

Theo khía cạnh thứ mười của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD ($^\circ$) ở khoảng: 5,2, 6,6, 7,1, 15,7, 19,1, và 25,0.

Theo khía cạnh thứ mười một của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có độ phản xạ 2θ theo phân tích XRPD ($^\circ$) ở khoảng: 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8, và 23,3.

Theo khía cạnh thứ mười hai của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể có mẫu nhiễu xạ XRPD về cơ bản như thể hiện trên hình bất kỳ trong số hình 3, hình 4, hình 5, hình 6, hình 7, hình 8, và hình 21.

Theo khía cạnh thứ mười ba của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 có các pic FT-IR (cm^{-1}) ở khoảng: 1743, 1713, 1688, 1454, 1378, 1208, và 1082.

Theo khía cạnh thứ mười bốn của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 có phổ FT-IR về cơ bản như thể hiện trên hình 7.

Theo khía cạnh thứ mười lăm của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 hầu như tinh khiết.

Theo khía cạnh thứ mười sáu của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể hầu như tinh khiết.

Theo khía cạnh thứ mười bảy của phương án thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng vô định hình hầu như tinh khiết.

Liều lượng, cách dùng, và sử dụng

Theo phương án thứ tư, sáng chế đề xuất dược phẩm để điều trị và/hoặc phòng ngừa tác nhân virus bất kỳ bằng cách sử dụng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 . Các tác nhân virus có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus gây bệnh viêm gan C, virus gây bệnh viêm gan B, virus gây bệnh viêm gan

A, virus tây sông Nil, virus gây bệnh sốt vàng, virus gây bệnh sốt xuất huyết, rinovirus, virus gây bệnh bại liệt, virus gây bệnh ỉa chảy do virus ở bò, virus gây bệnh viêm não Nhật Bản, hoặc các virus thuộc các nhóm *flavivirus*, *hepacivirus*, hoặc *flavavirus*.

Theo một khía cạnh của phương án này, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh nhiễm tác nhân virus bất kỳ được bọc lộ trong bản mô tả này, được phẩm này chứa môi trường được dụng được chọn trong số tá được, chất mang, chất pha loãng, và môi trường tương đương và hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 , nhằm bao gồm các hydrat, các solvat của nó, và dạng tinh thể bất kỳ của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 hoặc hydrat và solvat của nó.

Các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 có thể được độc lập bào chế ở nhiều dạng dùng qua đường miệng và chất mang. Dược phẩm dùng qua đường miệng có thể ở dạng viên nén, viên nén được bao, viên nang gelatin cứng và viên nang gelatin mềm, dung dịch, nhũ tương, si rô, hoặc huyền phù. Các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 là hiệu nghiệm khi được dùng ở dạng viên thuốc đạn, trong số các đường dùng khác. Cách dùng có hiệu quả nhất thường là đường miệng bằng cách áp dụng phác đồ liều hằng ngày thuận tiện mà có thể được điều chỉnh theo mức độ nghiêm trọng của bệnh và đáp ứng của bệnh nhân với thuốc chống virus.

Các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 cùng với một hoặc nhiều tá dược, chất mang, hoặc chất pha loãng thông thường, có thể được đưa vào dược phẩm và liều đơn vị. Dược phẩm và liều đơn vị có thể chứa các thành phần thông thường theo tỷ lệ thông thường, có hoặc không có các hoạt chất bổ sung và dạng liều đơn vị có thể chứa lượng hữu hiệu thích hợp bất kỳ của hoạt chất phù hợp với khoảng liều lượng hằng ngày dự kiến sẽ được sử dụng. Dược phẩm có thể được sử dụng ở dạng rắn, như viên nén hoặc viên nang nhồi, dạng bán rắn, dạng bột, dạng dược phẩm giải phóng chậm, hoặc dạng lỏng như huyền phù, nhũ tương, hoặc viên nang nhồi để sử dụng qua đường miệng; hoặc ở dạng viên thuốc đạn để dùng qua đường trực tràng hoặc qua đường âm đạo. Dược phẩm thông thường chứa 5% đến 95% hoạt chất hoặc các hoạt chất (trọng lượng).

Các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 có thể được dùng riêng lẻ nhưng thường được dùng kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang

được dụng thích hợp được chọn tùy theo đường dùng dự kiến và thực tiễn được học chuẩn.

Các dược phẩm dạng rắn bao gồm, ví dụ, bột, viên nén, viên tròn, viên nang, viên thuốc đạn, và hạt phân tán được. Chất mang rắn có thể là một hoặc nhiều hợp chất mà còn có thể hoạt động như chất pha loãng, các tác nhân tạo hương vị, chất hòa tan, chất làm trơn, các tác nhân tạo huyền phù, chất kết dính, chất bảo quản, các tác nhân làm rã viên nén, hoặc nguyên liệu bao nang. Ở bột, chất mang thường là chất rắn nghiền mịn là hỗn hợp với hoạt chất nghiền mịn. Ở viên nén, hoạt chất thường được trộn với chất mang có khả năng liên kết cần thiết theo tỷ lệ thích hợp và được ép thành viên với hình dạng và kích thước mong muốn. Chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, magie cacbonat, magie stearat, talc, đường, lactoza, pectin, dextrin, tinh bột, gelatin, tragacan, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, sáp nóng chảy ở nhiệt độ thấp, bơ cacao, và chất tương tự. Ngoài hoạt chất, các dược phẩm dạng rắn có thể chứa chất tạo màu, chất tạo vị, chất làm ổn định, chất đệm, chất làm ngọt nhân tạo và tự nhiên, tác nhân phân tán, chất làm đặc, chất hòa tan, và các chất tương tự. Ví dụ về dược phẩm rắn được minh họa trong EP 0524579; US 2002/0142050; US 2004/0224917; US 2005/0048116; US 2005/0058710; US 2006/0034937; US 2006/0057196; US 2006/0188570; US 2007/0026073; US 2007/0059360; US 2007/0077295; US 2007/0099902; US 2008/0014228; patent US 6,267,985; patent US 6,294,192; patent US 6,383,471; patent US 6,395,300; patent US 6,569,463; patent US 6,635,278; patent US 6,645,528; patent US 6,923,988; patent US 6,932,983; patent US 7,060,294; và patent US 7,462,608, tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Dược phẩm lỏng cũng là thích hợp để dùng qua đường miệng bao gồm dược phẩm lỏng bao gồm nhũ tương, si rô, cồn ngọt và huyền phù trong nước. Các dược phẩm này bao gồm cả các dược phẩm dạng rắn mà dự kiến được chuyển hóa thành dược phẩm dạng lỏng ngay trước khi sử dụng. Ví dụ về dược phẩm lỏng được minh họa trong patent US 3,994,974; 5,695,784; và 6,977,257. Nhũ tương có thể được bào chế trong dung dịch, ví dụ, trong dung dịch nước propylen glycol hoặc có thể chứa các tác nhân nhũ hóa như lexitin, sorbitan monooleat, hoặc acaxia. Huyền phù trong nước có thể được bào chế bằng cách phân tán hoạt chất đã nghiền mịn trong nước với

nguyên liệu nhót, như gôm tự nhiên hoặc gôm tổng hợp, nhựa, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, và các tác nhân tạo huyền phù mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết.

Các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 có thể được độc lập bào chế để dùng ở dạng viên thuốc đạn. Sáp nóng chảy ở nhiệt độ thấp, như hỗn hợp gồm các glyxerit của axit béo hoặc bơ cacao trước hết được làm nóng chảy và hoạt chất được phân tán vào một cách đồng nhất, ví dụ, bằng cách khuấy. Sau đó, hỗn hợp đồng nhất đã được làm nóng chảy được rót vào khuôn có kích thước thuận tiện, để nguội, và để hóa rắn.

Các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 có thể được độc lập bào chế để dùng qua đường âm đạo. Vòng nâng, tắm bông, kem bôi, gel, bột nhão, bột hoặc thuốc xịt mà ngoài hoạt chất còn chứa các chất mang như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là thích hợp. Các dược phẩm nhất định trong các dược phẩm này cũng có thể được sử dụng cùng với bao cao su ngừa thai có hoặc không có chất diệt tinh trùng.

Các dược phẩm thích hợp cùng với các chất mang, chất pha loãng và tá dược được dụng được bộc lộ trong ấn phẩm: *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 1995, biên tập bởi E. W. Martin, Mack Publishing Company, tái bản lần thứ 19, Easton, Pennsylvania, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Chuyên gia bào chế có thể cải biến các dược phẩm trong phạm vi bộc lộ của bản mô tả này để tạo ra nhiều dược phẩm cho một đường dùng cụ thể mà không làm cho các dược phẩm chứa các hợp chất được dự tính theo sáng chế kém bền vững hoặc bị giảm dược tính của chúng.

Ngoài ra, các hợp chất đã được tinh chế có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 có thể được độc lập bào chế cùng với liposom hoặc mixen. Đối với liposom, dự tính rằng các hợp chất đã được tinh chế có thể được bào chế theo cách như đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 4,797,285; 5,013,556; 5,077,056; 5,077,057; 5,154,930; 5,192,549; 5,213,804; 5,225,212; 5,277,914; 5,316,771; 5,376,380; 5,549,910; 5,567,434; 5,736,155; 5,827,533; 5,882,679; 5,891,468; 6,060,080; 6,132,763; 6,143,321; 6,180,134; 6,200,598; 6,214,375; 6,224,903; 6,296,870; 6,653,455; 6,680,068; 6,726,925; 7,060,689; và 7,070,801, tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Đối với mixen, dự tính rằng các hợp chất đã được tinh chế có thể được bào chế theo cách

như đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,145,684 và 5,091,188, cả hai patent này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo phương án thứ năm, sáng chế đề xuất việc bào chế thuốc bằng cách sử dụng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 nhằm điều trị tình trạng bệnh lý bất kỳ do nhiễm tác nhân bất kỳ trong số các tác nhân virus sau: virus gây bệnh viêm gan C, virus tây sông Nil, virus gây bệnh sốt vàng, virus gây bệnh sốt xuất huyết, rinovirus, virus gây bệnh bại liệt, virus gây bệnh viêm gan A, virus gây bệnh ia chảy do virus ở bò và virus gây bệnh viêm não Nhật Bản.

Thuật ngữ "thuốc" có nghĩa là chất dùng trong phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa cho đối tượng có nhu cầu, trong đó chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dược phẩm, chế phẩm, dạng liều, và dạng tương tự, chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 . Dự tính rằng việc sử dụng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 để bào chế thuốc, để điều trị tình trạng bệnh lý kháng virus bất kỳ, được bộc lộ trong bản mô tả này, riêng rẽ hoặc kết hợp với hợp chất khác được bộc lộ trong bản mô tả này. Thuốc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dược phẩm bất kỳ trong số các dược phẩm được đề xuất theo phương án thứ tư như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo phương án thứ sáu, sáng chế mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa ở đối tượng có nhu cầu, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 .

Dự tính rằng đối tượng có nhu cầu là đối tượng mắc tình trạng bệnh lý bất kỳ do nhiễm tác nhân virus bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus gây bệnh viêm gan C, virus tây sông Nil, virus gây bệnh sốt vàng, virus gây bệnh sốt xuất huyết, rinovirus, virus gây bệnh bại liệt, virus gây bệnh viêm gan A, virus gây bệnh ia chảy do virus ở bò hoặc virus gây bệnh viêm não Nhật Bản, virus *Flaviviridae* hoặc flavivirus hoặc *hepacivirus* hoặc tác nhân của virus gây ra các triệu chứng bằng hoặc tương đương với virus bất kỳ trong số các virus nêu trên.

Thuật ngữ "đối tượng" có nghĩa là động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bò, lợn, cừu, gà, gà tây, trâu, lạc đà, đà điểu, chó, mèo, và người, tốt hơn nếu đối tượng là người. Dự tính rằng, phương pháp điều trị đối tượng của nó theo

phương án thứ chín có thể sử dụng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất được dự tính theo sáng chế, riêng rẽ hoặc kết hợp với hợp chất khác được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu để điều trị bệnh" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là lượng cần thiết để làm giảm các triệu chứng của bệnh ở cá thể. Liều lượng sẽ được điều chỉnh theo yêu cầu riêng trong mỗi trường hợp cụ thể. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng rộng tùy theo nhiều yếu tố như mức độ nghiêm trọng của bệnh cần được điều trị, lứa tuổi và tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân, các thuốc khác mà bệnh nhân đang dùng để điều trị bệnh, đường dùng và dạng dùng và sự ưu tiên và kinh nghiệm của thầy thuốc điều trị. Để dùng qua đường miệng, liều lượng hằng ngày nằm trong khoảng từ 0,001g đến 10g, bao gồm tất cả các trị số trong khoảng đó, như 0,001, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,050, 0,075, 0,1, 0,125, 0,150, 0,175, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, và 9,5, hằng ngày sẽ là thích hợp trong phép điều trị riêng rẽ và/hoặc trong phép điều trị kết hợp. Liều lượng hằng ngày cụ thể nằm trong khoảng từ 0,01g đến 1g mỗi ngày, bao gồm tất cả các trị số gia tăng 0,01g (tức là 10mg) trong khoảng này, liều lượng hằng ngày được ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,01g đến 0,8g mỗi ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01g đến 0,6g mỗi ngày, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,01mg đến 0,25g mỗi ngày, mỗi khoảng liều lượng này đều bao gồm tất cả các trị số gia tăng 0,01g trong khoảng đó. Nói chung, việc điều trị được bắt đầu bằng "liều nạp" ban đầu lớn để nhanh chóng làm giảm hoặc loại bỏ virus, tiếp theo giảm liều lượng đến mức độ đủ để phòng ngừa nhiễm lại. Chuyên gia trong lĩnh vực điều trị các bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này sẽ có thể, không cần thử nghiệm quá mức và dựa vào kiến thức, kinh nghiệm và phần bộc lộ của đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này, xác định được lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này đối với bệnh cụ thể và bệnh nhân cụ thể.

Hiệu quả điều trị bệnh có thể được đánh giá theo các thử nghiệm chức năng gan bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nồng độ protein như protein trong huyết thanh (ví dụ, albumin, yếu tố gây đông, phosphataza kiềm, aminotransferaza (ví dụ, alanin transaminaza, aspartat transaminaza), 5'-nucleosidaza, γ -glutaminyltranspeptidaza, v.v.), tổng hợp bilirubin, tổng hợp cholesteol, và tổng hợp axit mật; chức năng chuyển hóa

của gan bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuyển hóa hydrat cacbon, axit amin và chuyển hóa amoniac. Theo cách khác, hiệu quả điều trị bệnh có thể được theo dõi bằng cách đo ARN HCV. Các kết quả của các thử nghiệm này sẽ cho phép tối ưu hóa liều lượng.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa ở đối tượng có nhu cầu, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất được đại diện bởi hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p-4 , hoặc S_p-4 và lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của dược chất kháng virus khác; trong đó việc dùng này là đồng thời hoặc theo lựa chọn. Cần phải hiểu rằng, khoảng thời gian giữa lần dùng theo lựa chọn có thể nằm trong khoảng từ 1 giờ đến 24 giờ, kể cả khoảng phụ bất kỳ nằm trong khoảng này, bao gồm 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, và 23 giờ.

Ví dụ về "dược chất kháng virus khác" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất ức chế HCV proteaza NS3 (xem EP 1881001, US 2003187018, US 2005267018, WO 2003006490, WO 200364456, WO 2004094452, WO 2005028502, WO 2005037214, WO 2005095403, WO 2007014920, WO 2007014921, WO 2007014922, WO 2007014925, WO 2007014926, WO 2007015824, WO 2008010921, và WO 2008010921); các chất ức chế HCV NS5B (xem US 2004229840, US 2005154056, US 2005-98125, US 20060194749, US 20060241064, US 20060293306, US 2006040890, US 2006040927, US 2006166964, US 2007275947, US 6784166, US20072759300, WO 2002057287, WO 2002057425, WO 2003010141, WO 2003037895, WO 2003105770, WO 2004000858, WO 2004002940, WO 2004002944, WO 2004002977, WO 2004003138, WO 2004041201, WO 2004065367, WO 2004096210, WO 2005021568, WO 2005103045, WO 2005123087, WO 2006012078, WO 2006020082, WO 2006065335, WO 2006065590, WO 2006093801, WO 200702602, WO 2007039142, WO 2007039145, WO 2007076034, WO 2007088148, WO 2007092000, và WO2007095269); các chất ức chế HCV NS4 (xem WO 2005067900 và WO 2007070556); các chất ức chế HCV NS5a (xem US 2006276511, WO 2006035061, WO 2006100310, WO 2006120251, và WO 2006120252); các chất kháng thụ thể kiểu Toll (xem WO 2007093901); và các chất ức chế khác (xem WO

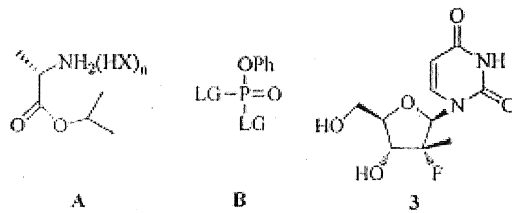
2000006529, WO 2003101993, WO 2004009020, WO 2004014313, WO 2004014852, và WO 2004035571); và các hợp chất đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/053,015, nộp ngày 21 tháng 3 năm 2008 (US 2010/0016251) (nội dung của các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), interferon- α , interferon- β , interferon- α đã được pegylat hóa, ribavirin, levovirin, viraclidin, chất ức chế nucleosit HCV polymeraza khác, chất ức chế polymeraza không là nucleosit của HCV, chất ức chế HCV proteaza, chất ức chế HCV helicaza hoặc chất ức chế dung hợp HCV.

Khi hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p -4, hoặc S_p -4 được dùng kết hợp với dược chất kháng virus khác, thì hoạt tính có thể tăng cao hơn hợp chất gốc. Khi việc điều trị là điều trị kết hợp, thì cách dùng này có thể là đồng thời hoặc lần lượt liên quan đến các chất dẫn xuất nucleosit. Do đó, thuật ngữ "dùng đồng thời" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm việc dùng các dược chất vào cùng một thời điểm hoặc vào các thời điểm khác nhau. Việc dùng hai hoặc nhiều dược chất vào cùng thời điểm có thể được thực hiện bằng một dược phẩm duy nhất chứa hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc bằng cách dùng gần như đồng thời hai hoặc nhiều dạng liều với một hoạt chất duy nhất.

Cần phải hiểu rằng việc viện dẫn đến việc điều trị bệnh trong bản mô tả này còn có nghĩa phòng ngừa cũng như điều trị các tình trạng bệnh lý hiện có. Hơn thế nữa, thuật ngữ "điều trị" bệnh nhiễm HCV, như được sử dụng trong bản mô tả này, còn bao gồm việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến hoặc do bệnh nhiễm HCV gây ra, hoặc các dấu hiệu lâm sàng của chúng.

Điều chế

Theo phương án thứ bảy, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất có công thức 4, R_p -4, hoặc S_p -4, phương pháp này bao gồm các bước: a) cho isopropyl-alanat, có công thức A, di-LG-phenylphosphat, có công thức B, 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin, có công thức 3, và bazơ phản ứng với nhau để thu được hỗn hợp thứ nhất chứa ít nhất hợp chất có công thức S_p -4 hoặc hợp chất có công thức R_p -4



trong đó X là bazơ tiếp hợp của axit, n bằng 0 hoặc 1, và LG là nhóm rời chuyển; b) cho hỗn hợp thứ nhất phản ứng với hợp chất bảo vệ để thu được hỗn hợp thứ hai chứa ít nhất hợp chất có công thức S_p-4 được bảo vệ hoặc hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ; và c) tùy ý đưa hỗn hợp thứ hai đến bước kết tinh, sắc ký, hoặc chiết để thu được hợp chất có công thức 4, S_p-4 , hoặc R_p-4 .

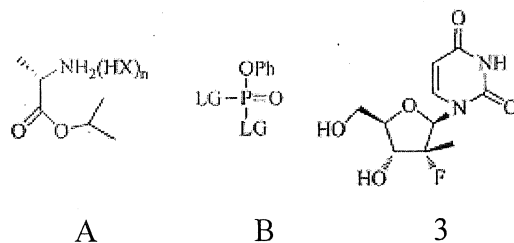
Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ bảy, isopropyl alanat có mặt ở dạng muối clorua của nó, mà tốt hơn là hầu như khan.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ bảy, bazơ là N-metylimidazol.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ bảy, tỷ lệ mol của hợp chất có công thức A so với hợp chất có công thức B so với hợp chất có công thức 3 là 1,6 : 1,3 : 1.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ bảy, hợp chất bảo vệ là t-butyl dimethylsilyl clorua.

Theo phương án thứ tám, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức S_p-4 hoặc R_p-4 , phương pháp này bao gồm các bước: a) cho isopropyl-alanat, có công thức A, di-LG-phenylphosphat, có công thức B, 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin, có công thức 3, và bazơ phản ứng với nhau để thu được hỗn hợp thứ nhất chứa ít nhất hợp chất có công thức S_p-4 hoặc hợp chất có công thức R_p-4



trong đó X là bazơ tiếp hợp của axit, n bằng 0 hoặc 1, và LG là nhóm rời chuyển; và b) tùy ý đưa hỗn hợp thứ hai đến bước kết tinh, sắc ký, hoặc chiết để thu được hợp chất có công thức S_p-4 hoặc R_p-4 được tinh chế.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ tám, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức R_p-4 , phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế hỗn hợp thứ hai hoặc hợp chất có công thức R_p-4 được tinh chế bằng cách hòa tan hoặc tạo

huyền phù hỗn hợp thứ hai hoặc hỗn hợp chứa hợp chất có công thức R_{p-4} được tinh chế trong dung môi; tùy ý tiếp theo tạo mầm bằng tinh thể có công thức R_{p-4} ; và bổ sung đủ kháng dung môi vào để thu được tinh thể có công thức R_{p-4} .

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ tám, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức S_{p-4} , quy trình này còn bao gồm bước tinh chế hỗn hợp thứ hai hoặc hợp chất có công thức S_{p-4} được tinh chế bằng cách d) hòa tan hoặc tạo huyền phù hỗn hợp thứ hai hoặc hợp chất có công thức S_{p-4} được tinh chế trong dung môi, tiếp theo tạo mầm bằng tinh thể S_{p-4} ở nhiệt độ trong phòng; gom chất rắn thứ nhất chủ yếu chứa hợp chất có công thức S_{p-4} ; hòa tan chất rắn thứ nhất trong dung môi ở nhiệt độ hồi lưu của nó; và làm nguội hoặc bổ sung kháng dung môi để thu được chất rắn thứ hai.

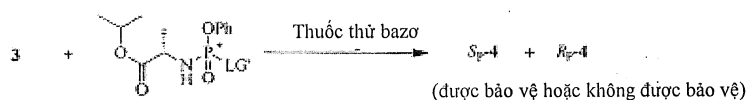
Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ tám, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức S_{p-4} , quy trình này còn bao gồm bước tinh chế S_{p-4} bằng cách d) hòa tan hoặc tạo huyền phù hỗn hợp thứ hai hoặc hỗn hợp chứa hợp chất có công thức S_{p-4} được tinh chế trong dung môi thứ nhất, tiếp theo bổ sung kháng dung môi để thu được chế phẩm thứ nhất, trong đó dung môi/kháng dung môi còn sót lại được loại bỏ bằng cách gạn để thu được cặn; xử lý cặn này bằng dung dịch chứa dung môi thứ nhất và kháng dung môi để tạo ra chế phẩm thứ hai, nhờ đó khi làm giảm áp suất tạo ra chất rắn thứ nhất; hòa tan hoặc tạo huyền phù chất rắn thứ nhất bằng cách sử dụng dung môi thứ hai để thu được chế phẩm thứ ba; bổ sung mầm tinh thể có công thức S_{p-4} vào chế phẩm thứ ba; gom chất rắn thứ hai; hòa tan hoặc tạo huyền phù chất rắn thứ hai trong dung môi thứ ba, tùy ý đun nóng đến nhiệt độ hồi lưu của dung môi thứ ba để thu được chế phẩm thứ tư, và, nếu cần, làm nguội chế phẩm thứ tư để thu được chất rắn thứ ba chứa hợp chất có công thức S_{p-4} mà được gom bằng cách lọc.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ tám, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức S_{p-4} , hợp chất có công thức S_{p-4} này được tinh chế thêm bằng hỗn hợp thứ hai hoặc hợp chất có công thức S_{p-4} được tinh chế bằng cách d) bổ sung gel silic dioxit vào hỗn hợp thứ hai hoặc hợp chất có công thức S_{p-4} được tinh chế, tiếp theo làm bay hơi dung môi để tạo ra huyền phù đặc khô; khuấy huyền phù đặc khô này trong hỗn hợp dung môi thứ nhất/kháng dung môi để thu được huyền phù đặc ướt thứ nhất; gạn hỗn hợp dung môi thứ nhất/kháng dung môi ra khỏi huyền phù đặc

uớt thứ nhất để thu được huyền phù đặc uớt thứ hai và chế phẩm thứ nhất; bổ sung vào huyền phù đặc uớt thứ hai hỗn hợp dung môi thứ hai/kháng dung môi, tiếp theo khuấy; gạn hỗn hợp dung môi thứ hai/kháng dung môi ra khỏi huyền phù đặc uớt thứ hai để thu được huyền phù đặc uớt thứ ba và chế phẩm thứ hai; tùy ý lặp lại các bước từ g) đến h) đối với huyền phù đặc uớt thứ ba hoặc các huyền phù đặc uớt bổ sung; làm bay hơi dung môi ra khỏi chế phẩm thứ hai, và tùy ý chế phẩm bổ sung bất kỳ thu được từ bước bổ sung i) để thu được chất rắn thứ nhất; hòa tan hoặc tạo huyền phù chất rắn thứ nhất này trong dung dịch chứa dung môi thứ ba và tùy ý dung môi thứ tư để thu được chế phẩm thứ ba; tùy ý bổ sung mầm tinh thể có công thức S_p-4 vào chế phẩm thứ ba; thu được từ chế phẩm thứ ba chất rắn thứ hai chứa hợp chất có công thức S_p-4 ; và tùy ý kết tinh lại chất rắn thứ hai bằng cách sử dụng dung môi thứ ba để thu được chất rắn thứ ba chứa hợp chất có công thức S_p-4 .

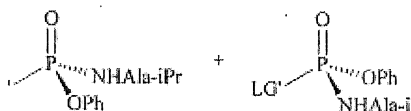
Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu được rằng các hợp chất có thể được tách bằng cách chiết thông thường, cách kết tinh thông thường hoặc các kỹ thuật sắc ký thông thường. Các kỹ thuật sắc ký thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sắc ký trên silicagel (bằng cách sử dụng, ví dụ, 3% đến 5% metanol trong DCM hoặc 4% đến 6% isopropanol trong DCM) để tạo ra nồng độ cao hơn của một chất đồng phân (từ 50% đến 100%) và sau đó kết tinh nó. Theo cách khác, có thể áp dụng phương pháp sắc ký pha đảo (bằng cách sử dụng, ví dụ, 1% đến 30% pha động trong nước-axetonitril). Ngoài ra, các hợp chất này có thể được tách bằng cách sắc ký lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid sắc ký - SFC) bằng cacbon dioxid làm dung môi chính và rượu như metanol làm chất cải biến, tốt hơn là bằng cách sử dụng môi trường không đối xứng thích hợp, như Daicel Chiralpack IA. Theo cách khác, sắc ký SMB có thể được áp dụng bằng cách sử dụng môi trường không đối xứng thích hợp, như Daicel ChiralPack IA, bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm các dung môi như hexan/isopropanol hoặc các dung môi đơn lẻ như etyl axetat.

Theo phương án thứ chín, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức S_p-4 , phương pháp này bao gồm các bước: a) cho isopropyl-alanyl-phosphoramidat phản ứng với hợp chất có công thức 3 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ ở nguyên tử O ở vị trí 3', và thuốc thử bazơ để thu được chế phẩm chứa hợp chất có công thức S_p-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ



hỗn hợp gồm các chất
đồng phân không đối quang

trong đó isopropyl-alanyl-phosphoramidat chứa trong hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang được đại diện bởi các công thức cấu trúc sau:



trong đó tỷ lệ C:C' bằng 1:1.

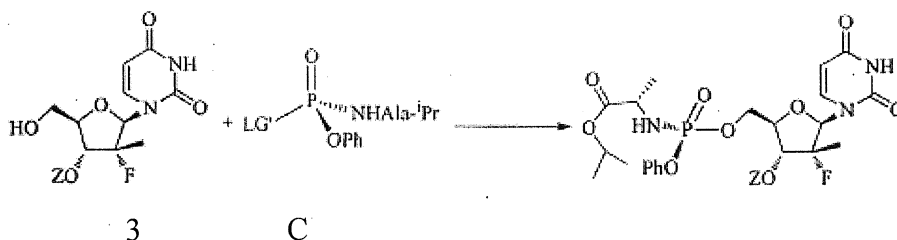
Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua và tỷ lệ C:C' là lớn hơn hoặc bằng 1:1.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua và tỷ lệ C:C'; là lớn hơn 1:1.

Theo khía cạnh thứ ba, thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua và tỷ lệ C:C' ít nhất bằng khoảng 1,5:1, khoảng 2,3:1, khoảng 4:1, khoảng 5,7:1, khoảng 9:1, khoảng 19:1, khoảng 32,3:1, khoảng 49:1, hoặc khoảng 99:1.

Theo khía cạnh thứ tư, LG' được chọn trong số 2,4-dinitrophenoxit, 4-nitrophenoxit, 2-nitrophenoxit, 2-clo-4-nitrophenoxit, 2,4-diclophenoxit, và pentaflorphenoxit, thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua, và tỷ lệ C:C' ít nhất bằng 1,5:1, khoảng 2,3:1, khoảng 4:1, khoảng 5,7:1, khoảng 9:1, khoảng 19:1, khoảng 32,3:1, khoảng 49:1, hoặc khoảng 99:1.

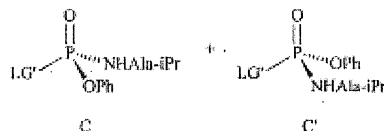
Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức Sp-4, quy trình này bao gồm các bước: a) cho isopropyl-alanyl-phosphoramidat (C) phản ứng với hợp chất có công thức 3 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ ở nguyên tử O ở vị trí 3', và thuốc thử bazơ để thu được chế phẩm chứa hợp chất có công thức Sp-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ



trong đó Z là nhóm bảo vệ hoặc hydro; LG' là nhóm rời chuyển; và b) tùy ý đưa hợp chất có công thức Sp-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ thu được đến bước sắc ký,

chiết, hoặc bước kết tinh để thu được hợp chất có công thức S_p-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ được tinh chế. Theo phương án phụ, LG' là tosylat, camphorsulfonat, hoặc aryloxit được thế bằng ít nhất một nhóm rút điện tử; tốt hơn nữa nếu LG' được chọn trong số 2,4-dinitrophenoxit, 4-nitrophenoxit, 2-nitrophenoxit, 2-clo-4-nitrophenoxit, 2,4-diclophenoxit, hoặc pentaflorphenoxit. Theo phương án phụ khác nữa, nếu S_p-4 được bảo vệ, tức là Z không là hydro, thì quy trình theo phương án thứ chín được hướng tiếp đến bước khử bảo vệ hợp chất có công thức S_p-4 đã được bảo vệ. Theo phương án phụ khác nữa, phản ứng này được thực hiện trong dung môi không proton phân cực, như tetrahydrofuran hoặc dung môi ete khác riêng rẽ hoặc kết hợp với nhau hoặc với nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon, như axetonitril.

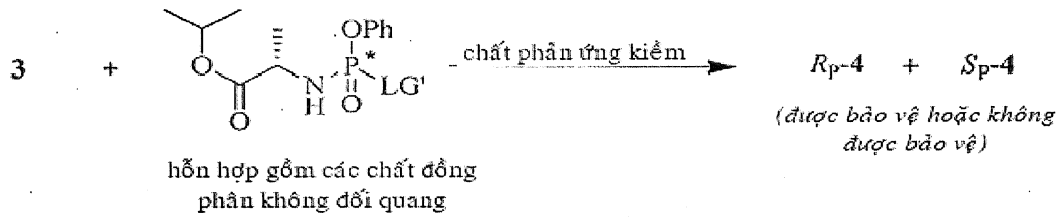
Quy trình theo phương án thứ chín còn bao gồm các bước: 1) cho $(LG')P(O)(LG)_2$, trong đó LG , độc lập với LG' , là nhóm rời chuyển, phản ứng với (i) isopropyl-alanat và bazơ thứ nhất để thu được $(LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr)$, tiếp theo cho $(LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ phản ứng với phenol và bazơ thứ hai để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C' , (ii) phenol và bazơ thứ nhất để thu được $(LG')P(O)(LG)(OPh)$, tiếp theo cho $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ phản ứng với isopropyl-alanat và bazơ thứ hai để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C' , hoặc (iii) kết hợp isopropyl-alanat, phenol, và ít nhất một bazơ để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C' ; hoặc 2) cho $(PhO)P(O)(LG)_2$, trong đó LG là nhóm rời chuyển, phản ứng với (i) isopropyl-alanat và bazơ thứ nhất để thu được $(PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr)$, tiếp theo cho $(PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ phản ứng với tiền chất chứa nhóm rời chuyển $(LG'H)$ và bazơ thứ hai để thu được hỗn hợp chứa C và C' ,



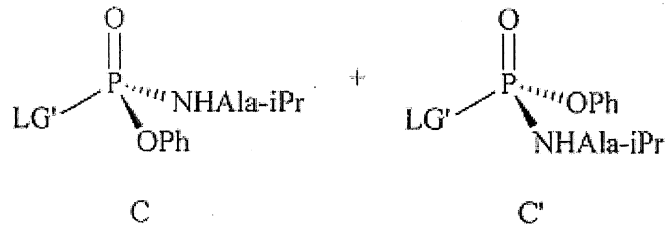
và đưa hỗn hợp này đến bước sắc ký hoặc kết tinh hỗn hợp để thu được C . Theo một khía cạnh của phương án thứ chín, isopropyl alanat có mặt ở dạng muối clorua của nó, tốt hơn là hầu như khan.

Theo phương án thứ mười, sáng chế đề xuất quy trình điều chế R_p-4 , phương pháp này gồm các bước: a) cho isopropyl-alanyl-phosphoramidat phản ứng với hợp chất có công thức 3 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ ở nguyên tử O ở vị trí 3', và

thuốc thử bazơ để thu được chế phẩm chứa hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ



trong đó isopropyl-alanyl-phosphoramidat chứa trong hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang được đại diện bởi các công thức cấu trúc sau:



trong đó tỷ lệ $C':C$ bằng 1:1.

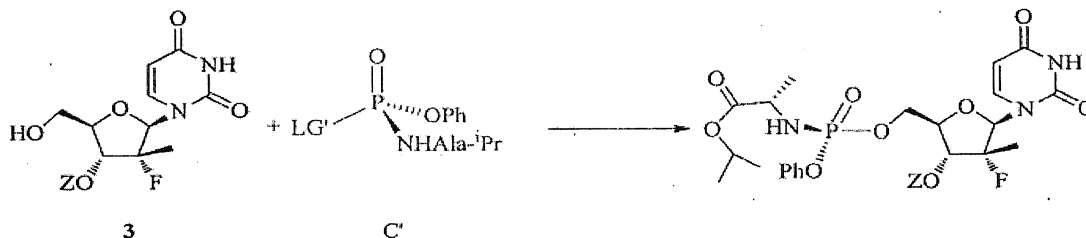
Theo khía cạnh thứ nhất, thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua và tỷ lệ $C':C$ là lớn hơn hoặc bằng 1:1.

Theo khía cạnh thứ hai, thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua và tỷ lệ $C':C$ là lớn hơn 1:1.

Theo khía cạnh thứ ba, thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua và tỷ lệ $C':C$ ít nhất bằng 1,5:1, khoảng 2,3:1, khoảng 4:1, khoảng 5,7:1, khoảng 9:1, khoảng 19:1, khoảng 32,3:1, khoảng 49:1, hoặc khoảng 99:1.

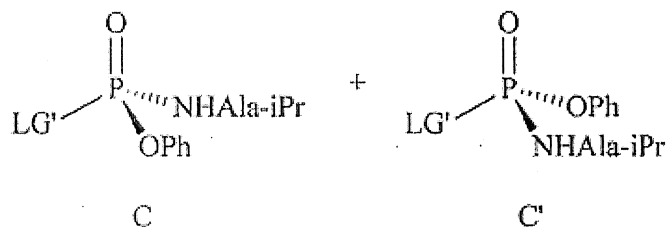
Theo khía cạnh thứ tư, LG' là p-nitrophenoxit, thuốc thử bazơ là t-butylmagie clorua, và tỷ lệ $C':C$ ít nhất bằng 1,5:1, khoảng 2,3:1, khoảng 4:1, khoảng 5,7:1, khoảng 9:1, khoảng 19:1, khoảng 32,3:1, khoảng 49:1, hoặc khoảng 99:1.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức R_p-4 , quy trình này bao gồm các bước: a) cho isopropyl-alanyl-phosphoramidat (C') phản ứng với hợp chất có công thức 3 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ ở nguyên tử O ở vị trí 3', và thuốc thử bazơ để thu được chế phẩm chứa hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ



trong đó Z là nhóm bảo vệ hoặc hydro; LG' là nhóm rời chuyên; và b) tùy ý đưa hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ thu được đến bước sắc ký, chiết, hoặc bước kết tinh để thu được hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ hoặc không được bảo vệ được tinh chế. Theo phương án phụ, LG' là tosylat, camphorsulfonat, hoặc aryloxit được thế bằng ít nhất một nhóm rút điện tử; tốt hơn nữa nếu LG' được chọn trong số p-nitrophenoxit, 2,4-dinitrophenoxit, và pentaflorphenoxit. Theo phương án phụ khác nữa, nếu hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ, tức là Z không là hydro, quy trình theo phương án thứ chín được hướng tiếp đến bước khử bảo vệ hợp chất có công thức R_p-4 được bảo vệ. Theo phương án phụ khác nữa, phản ứng được thực hiện trong dung môi không proton phân cực, như tetrahydrofuran hoặc dung môi ete khác riêng rẽ hoặc kết hợp với nhau hoặc với nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon, như axetonitril.

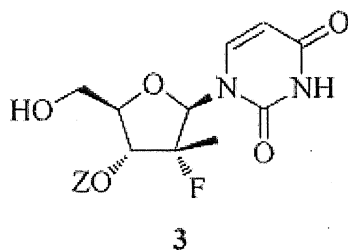
Quy trình theo phương án thứ mười còn bao gồm các bước: 1) cho $(LG')P(O)-(LG)_2$, trong đó LG, độc lập với LG', là nhóm rời chuyên, phản ứng với (i) isopropylalanat và bazơ thứ nhất để thu được $(LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr)$, tiếp theo cho $(LG')P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ phản ứng với phenol và bazơ thứ hai để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C', (ii) phenol và bazơ thứ nhất để thu được $(LG')P(O)(LG)(OPh)$, tiếp theo cho $(LG')P(O)(LG)(OPh)$ phản ứng với isopropylalanat và bazơ thứ hai để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C', hoặc (iii) kết hợp isopropylalanat, phenol, và ít nhất một bazơ để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C'; hoặc 2) cho $(PhO)P(O)(LG)_2$, trong đó LG', độc lập với LG, là nhóm rời chuyên, phản ứng với (i) isopropylalanat và bazơ thứ nhất để thu được $(PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr)$, tiếp theo cho $(PhO)P(O)(LG)(NHAla-iPr)$ phản ứng với tiền chất chứa nhóm rời chuyên và bazơ thứ hai để thu được hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C'



và đưa hỗn hợp này đến bước sắc ký hoặc kết tinh hỗn hợp để thu được hợp chất có công thức C'. Theo một khía cạnh của phương án thứ chín, isopropyl alanat có mặt ở dạng muối clorua của nó, tốt hơn là hầu như khan.

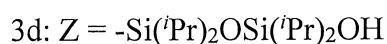
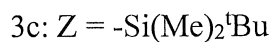
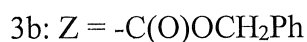
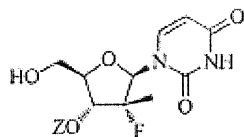
Theo phương án thứ mười một, sáng chế đề xuất chế phẩm thu được theo các quy trình theo phương án thứ bảy, phương án thứ tám, phương án thứ chín hoặc phương án thứ mười cũng như các khía cạnh tương ứng của chúng. Theo một khía cạnh của phương án thứ mười một, sáng chế đề xuất chế phẩm thu được theo phương án bất kỳ trong số các phương án được minh họa dưới đây. Chế phẩm thu được theo cách này có thể ở dạng tinh thể, kiểu tinh thể, vô định hình, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo phương án thứ mười hai, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 3

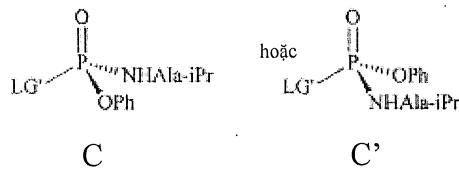


trong đó Z là nhóm bảo vệ hoặc hydro; là hữu dụng để điều chế hợp chất có công thức R_p -4 hoặc S_p -4.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ mười hai, sáng chế đề xuất hợp chất được chọn trong số hợp chất có công thức cấu trúc sau



Theo phương án thứ mười ba, sáng chế đề xuất hợp chất, muối, hydrat, solvat của nó, hoặc hỗn hợp của chúng, đại diện bởi các công thức cấu trúc sau



trong đó LG' là nhóm rời chuyển, là hữu dụng để điều chế hợp chất có công thức R_p-4 hoặc S_p-4 .

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ mười ba, LG' là tosylat, camphorsulfonat, aryloxit, hoặc aryloxit được thế bằng ít nhất một nhóm rút điện tử.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ mười ba, LG' được chọn trong số 2,4-dinitrophenoxit, 4-nitrophenoxit, 2-nitrophenoxit, 2-clo-4-nitrophenoxit, 2,4-diclophenoxit, hoặc pentaflorphenoxit.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ mười ba, LG' là pentaflorphenoxit hoặc 4-nitrophenoxit.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ mười ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức C, trong đó LG' là 2,4-dinitrophenoxit, 4-nitrophenoxit, 2-nitrophenoxit, 2-clo-4-nitrophenoxit, 2,4-diclophenoxit, hoặc pentaflorphenoxit.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ mười ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức C, trong đó LG' là 4-nitrophenoxit hoặc pentaflorphenoxit.

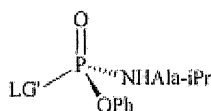
Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thứ mười ba đề xuất hợp chất có công thức C, trong đó LG' là 4-nitrophenoxit.

Theo khía cạnh thứ bảy của phương án thứ mười ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức C ở dạng tinh thể, trong đó LG' là 4-nitrophenoxit.

Theo khía cạnh thứ tám của phương án thứ mười ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức C, trong đó LG' là pentaflorphenoxit.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ mười ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức C ở dạng tinh thể, trong đó LG' là pentaflorphenoxit.

Theo phương án thứ mười bốn, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất được đại diện bởi công thức cấu trúc



C

kết tinh hợp chất từ chế phẩm chứa:

- a) chế phẩm thứ nhất;
- b) tiền chất thứ hai chứa nhóm rời chuyển;
- c) bazơ không ưa ái nhân; và
- d) chế phẩm lỏng;

trong đó chế phẩm thứ nhất chứa hợp chất và chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P tương ứng của nó.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ mười bốn, lượng tính theo mol của hợp chất và lượng tính theo mol của chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P của nó là giống nhau hoặc khác nhau.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ mười bốn, lượng tính theo mol của hợp chất là lớn hơn lượng tính theo mol của chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P tương ứng của nó hoặc ngược lại.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ mười bốn, tiền chất thứ hai chứa nhóm rời chuyển là 2,4-dinitrophenol, 4-nitrophenol, 2-nitrophenol, 2-clo-4-nitrophenol, 2,4-diclophenol, hoặc pentaflorphenol.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ mười bốn, LG' là pentaflorphenoxit. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, tiền chất thứ hai chứa nhóm rời chuyển là pentaflorphenol. Theo khía cạnh phụ thứ hai, lượng pentaflorphenol nằm trong khoảng từ 0,01 đương lượng mol đến 10 đương lượng mol so với lượng tính theo mol của hợp chất và chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P của nó và tất cả các đương lượng mol trong khoảng đó. Theo khía cạnh phụ thứ ba, lượng pentaflorphenol nằm trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 1 đương lượng mol so với lượng tính theo mol của hợp chất và chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P của nó và tất cả các đương lượng mol trong khoảng đó.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ mười bốn, bước kết tinh xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến $+40^{\circ}\text{C}$ và tất cả các trị số nhiệt độ trong khoảng đó. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, bước kết tinh xảy ra ở nhiệt độ trong phòng.

Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thứ mười bốn, bazơ không ưa ái nhân được chọn trong số kali cacbonat, xezi cacbonat, di-isopropylamin, di-

isopropyletylamin, trietylamin, quinuclidin, naphthalen-1,8-diamin, 2,2,6,6-tetrametylpiperidin, 1,8-diazabicycloundec-7-en, 4-dimetylamino-pyridin, pyridin, 2,6-di-C₁₋₆-alkyl-pyridin, 2,4,6-tri-C₁₋₆-alkyl-pyridin, và hỗn hợp của chúng. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, bazơ không ưa ái nhân là trietylamin hoặc 1,8-diazabicycloundec-7-en. Theo khía cạnh phụ thứ hai, bazơ không ưa ái nhân là trietylamin.

Theo khía cạnh thứ bảy của phương án thứ mười bốn, bazơ không ưa ái nhân có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đương lượng mol đến 10 đương lượng mol, và tất cả đương lượng mol trong khoảng này, so với tổng lượng tính theo mol của hợp chất và chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P của nó. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, bazơ không ưa ái nhân có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 1 đương lượng mol, và tất cả đương lượng mol trong khoảng này, so với tổng lượng tính theo mol của hợp chất và chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P của nó.

Theo khía cạnh thứ tám của phương án thứ mười bốn, độ hòa tan của hợp chất này là thấp hơn độ hòa tan của chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P tương ứng của nó trong chế phẩm lỏng hoặc ngược lại.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ mười bốn, chế phẩm lỏng chứa ít nhất dung môi hoặc kháng dung môi. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: rượu có 1 đến 8 nguyên tử cacbon, ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, keton có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, clocacbon có 1 đến 2 nguyên tử cacbon, nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon, hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon thơm có 6 đến 12 nguyên tử cacbon. Theo khía cạnh phụ thứ hai, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon thơm có 6 đến 12 nguyên tử cacbon. Theo khía cạnh phụ thứ ba, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon. Theo khía cạnh phụ thứ tư, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: etyl axetat, t-butyl-metylete, và hexan. Theo khía cạnh phụ thứ năm, chế phẩm lỏng chứa etyl axetat và hexan. Theo khía cạnh phụ thứ sáu, chế phẩm lỏng chứa t-butyl-metylete và hexan.

Theo khía cạnh thứ mười của phương án thứ mười bốn, lượng hợp phân lỏng nằm trong khoảng từ 1ml đến 10ml cho mỗi gam chế phẩm thứ nhất và tất cả các trị số ml/g trong khoảng đó.

Theo khía cạnh thứ mười một của phương án thứ mười bốn, quy trình này còn bao gồm bước bổ sung hợp chất ở dạng tinh thể vào chế phẩm. Một khía cạnh phụ còn bao gồm việc bổ sung khoảng 0,1% đến 1% trọng lượng, và tất cả các trị số % trọng lượng trong khoảng này, hợp chất ở dạng tinh thể vào chế phẩm thứ nhất.

Theo khía cạnh thứ mười hai của phương án thứ mười bốn, quy trình này còn bao gồm các bước:

a) cho PhOP(O)(LG)_2 và $^i\text{Pr-Ala-NH}_2\cdot\text{HCl}$ phản ứng với sự có mặt của bazơ thứ nhất để thu được $(\text{PhO})\text{P(O)(LG)(NHAla-}^i\text{Pr)}$;

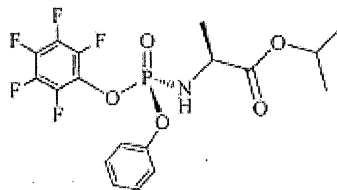
b) cho $(\text{PhO})\text{P(O)(LG)(NHAla-}^i\text{Pr)}$ phản ứng với tiền chất thứ nhất chứa nhóm rời chuyển (LG'H) với sự có mặt của bazơ thứ hai để thu được chế phẩm chứa hợp chất và chất đồng phân không đối quang trên cơ sở P của nó;

trong đó LG and LG', độc lập với nhau, là các nhóm rời chuyển;

trong đó tiền chất thứ nhất chứa nhóm rời chuyển và tiền chất thứ hai chứa nhóm rời chuyển là giống nhau hoặc khác nhau; và

trong đó bazơ thứ nhất và bazơ thứ hai là giống nhau hoặc khác nhau.

Theo phương án thứ mười lăm, sáng chế đề xuất quy trình điều chế (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể có công thức cấu trúc sau:



quy trình này bao gồm các bước:

kết tinh (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ra khỏi chế phẩm thứ hai chứa

- chế phẩm thứ nhất;
- pentaflophenol;
- bazơ không ưa ái nhân; và
- chế phẩm lỏng;

trong đó chế phẩm thứ nhất chứa (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat và (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ mười lăm, lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat và lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat là giống nhau hoặc khác nhau.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ mười lăm, lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat là lớn hơn lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ mười lăm, lượng pentaflorphenol nằm trong khoảng từ 0,01 đương lượng mol đến 10 đương lượng mol (và tất cả các trị số đương lượng mol trong khoảng đó) so với lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat và (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, lượng pentaflorphenol nằm trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 1 đương lượng mol (và tất cả các trị số đương lượng mol trong khoảng đó) so với lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat và (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ mười lăm, bước kết tinh xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến $+40^{\circ}\text{C}$ và tất cả các trị số nhiệt độ trong khoảng đó. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, bước kết tinh xảy ra ở nhiệt độ trong phòng.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ mười lăm, bazơ không ưa ái nhân được chọn trong số kali cacbonat, xêzi cacbonat, di-isopropylamin, di-isopropyletylamin, trietylamin, quinuclidin, naphthalen-1,8-diamin, 2,2,6,6-tetrametylpiperidin, 1,8-diazabicycloundec-7-en, 4-dimetylamino-pyridin, pyridin, 2,6-di- C_{1-6} -alkyl-pyridin, 2,4,6-tri- C_{1-6} -alkyl-pyridin, và hỗn hợp của chúng. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, bazơ không ưa ái nhân là trietylamin hoặc 1,8-diazabicycloundec-7-en. Theo khía cạnh phụ thứ hai, bazơ không ưa ái nhân là trietylamin.

Theo khía cạnh thứ sáu của phương án thứ mười lăm, bazơ không ưa ái nhân có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 đương lượng mol (và tất cả các trị số đương lượng mol trong khoảng đó) so với tổng lượng tính theo mol của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat và (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

Theo khía cạnh thứ bảy của phương án thứ mười lăm, độ hòa tan của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat là thấp hơn độ hòa tan của (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat trong chế phẩm lỏng.

Theo khía cạnh thứ tám của phương án thứ mười lăm, chế phẩm lỏng chứa ít nhất dung môi hoặc kháng dung môi. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: rượu có 1 đến 8 nguyên tử cacbon, ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, keton có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, clocacbon có 1 đến 2 nguyên tử cacbon, nitril có 2 đến 7 nguyên tử cacbon, hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon thơm có 6 đến 12 nguyên tử cacbon. Theo khía cạnh phụ thứ hai, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon thơm có 6 đến 12 nguyên tử cacbon. Theo khía cạnh phụ thứ ba, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: ete có 2 đến 8 nguyên tử cacbon, este có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, và hydrocacbon no có 5 đến 12 nguyên tử cacbon. Theo khía cạnh phụ thứ tư, chế phẩm lỏng chứa ít nhất một trong số: etyl axetat, t-butyl-metylete, và hexan. Theo khía cạnh phụ thứ năm, chế phẩm lỏng chứa etyl axetat và hexan. Theo khía cạnh phụ thứ sáu, chế phẩm lỏng chứa t-butyl-metylete và hexan.

Theo khía cạnh thứ chín của phương án thứ mười lăm, lượng chế phẩm lỏng nằm trong khoảng từ 1ml đến 10ml cho mỗi gam (và tất cả các trị số ml/g nằm trong khoảng này) hợp phần thứ nhất.

Theo khía cạnh thứ mười của phương án thứ mười lăm, quy trình này còn bao gồm bước bổ sung (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể vào chế phẩm thứ hai.

Theo khía cạnh thứ mười một của phương án thứ mười lăm, quy trình này còn bao gồm bước bổ sung khoảng 0,1% trọng lượng đến 1% trọng lượng (và tất cả các trị số % trọng lượng trong khoảng này) (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể tính theo tổng khối lượng của (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat trong chế phẩm thứ nhất.

Theo phương án thứ mười sáu, sáng chế đề xuất (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể thu được theo quy trình của phương án thứ mười lăm.

Theo phương án thứ mười bảy, sáng chế đề xuất quy trình điều chế (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat, quy trình này bao gồm các bước:

kết tinh (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ra khỏi chế phẩm thứ hai chứa

- a) chế phẩm thứ nhất;
- b) pentaflorphenol;
- c) bazơ không ưa ái nhân; và
- d) chế phẩm lỏng;

trong đó chế phẩm thứ nhất chứa (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat và (S)-isopropyl 2-(((R)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat.

Theo khía cạnh thứ nhất của phương án thứ mười bảy, sáng chế đề xuất quy trình điều chế (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat, quy trình này bao gồm bước:

cho (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat tiếp xúc với sản phẩm thu được bằng cách cho t-butylmagie halogenua phản ứng với 1-(((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-metyltetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion với t-butylmagie halogenua.

Theo khía cạnh thứ hai của phương án thứ mười bảy, bước tiếp xúc xảy ra trong môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 40°C và tất cả các trị số nhiệt độ nằm trong khoảng đó.

Theo khía cạnh thứ ba của phương án thứ mười bảy, bước tiếp xúc xảy ra trong môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 30°C và tất cả các trị số nhiệt độ nằm trong khoảng đó.

Theo khía cạnh thứ tư của phương án thứ mười bảy, tỷ lệ mol của t-butylmagie halogenua với 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-metyltetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion nằm trong khoảng từ 2 đến 2,2. Theo khía cạnh phụ thứ nhất, tỷ lệ mol của t-butylmagie halogenua với 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-metyltetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion là khoảng 2,1.

Theo khía cạnh thứ năm của phương án thứ mười bảy, t-butylmagie halogenua là t-butylmagie clorua.

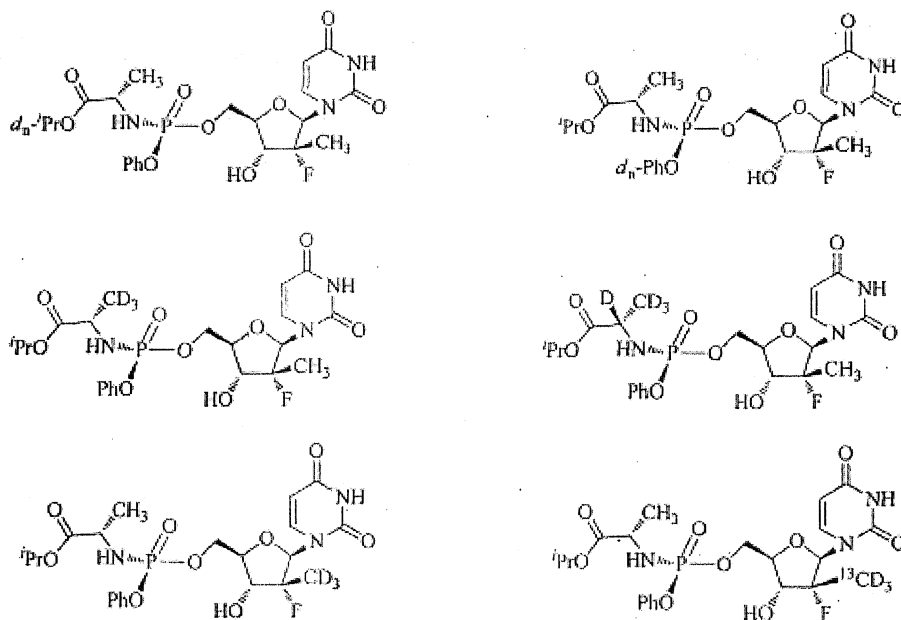
Theo phương án thứ mười tám, sáng chế đề xuất quy trình điều chế(S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat hầu như tinh khiết, quy trình này bao gồm các bước:

thu nhận (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat theo phương án bất kỳ trong số các phương án có liên quan được bộc lộ trong bản mô tả này; và

kết tinh (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat đã được tạo ra theo cách đó.

Theo phương án thứ mười chín, sáng chế đề xuất chất tương tự được đánh dấu đồng vị của hợp chất có công thức R_p-4 hoặc S_p-4 . Thuật ngữ chất tương tự "được đánh dấu đồng vị" chỉ chất tương tự của hợp chất có công thức R_p-4 hoặc S_p-4 mà là "chất tương tự được đơteri hóa", "chất tương tự được đánh dấu bằng ^{13}C ", hoặc "chất tương tự được đơteri hóa/được đánh dấu bằng ^{13}C ". Thuật ngữ "chất tương tự được đơteri hóa" có nghĩa là hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó đồng vị 1H ,

tức là hydro (H), được thế bằng đồng vị ^2H , tức là đơteri (D). Bước thế đơteri có thể là một phần hoặc hoàn toàn. Bước thế đơteri một phần có nghĩa là ít nhất một hydro được thế bằng ít nhất một đơteri. Ví dụ, đối với hợp chất có công thức R_p-4 hoặc S_p-4 , chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dự tính được ít nhất các chất tương tự được đơteri hóa một phần sau (trong đó " d_n " là n- số nguyên tử đơteri, như đối với nhóm isopropyl $n = 1-7$, trong khi đối với nhóm phenyl, $n = 1-5$), cũng như các chất có công thức sau.



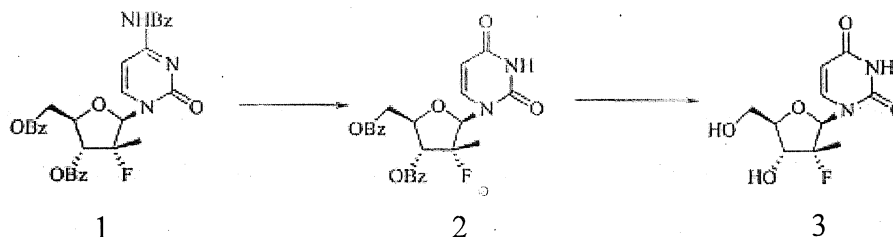
Mặc dù các nhóm methyl nêu trên được thể hiện là được đơteri hóa hoàn toàn, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng các biến thể đơteri hóa không hoàn toàn là có thể xảy ra, như $-\text{CDH}_2$ và $-\text{CD}_2\text{H}$. Các dấu đồng vị trên furanoza và bazo cũng được dự tính. Theo cách tương tự, các thuật ngữ "chất tương tự được đánh dấu bằng ^{13}C " và "chất tương tự được đơteri hóa/được đánh dấu bằng ^{13}C " được dùng chỉ hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó nguyên tử cacbon được làm giàu bằng đồng vị ^{13}C nghĩa là mức độ làm giàu vượt quá mức độ bình thường trong tự nhiên khoảng 1,1%.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau nhằm tạo điều kiện thuận lợi để hiểu rõ hơn bản mô tả này mà không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các khía cạnh tổng hợp

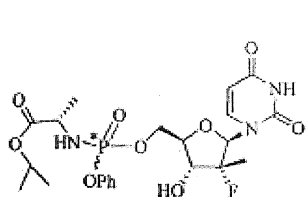
Để điều chế uridin nucleosit, có thể sử dụng chất trung gian xytidin được tribenzoyl hóa cấp cao trong quy trình tổng hợp một số chất tương tự có công thức 3 đã được diaxyl hóa ở vị trí 3' và 5' nhất định (xem dưới đây) đã được sản xuất một cách có hiệu quả ở quy mô sản xuất thử nghiệm (xem WO 2006/031725 hoặc US 2006/0122146, cả hai công bố đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Phương pháp sau được thấy là có thể thay đổi và có hiệu quả về mặt kinh tế.



3',5'-O-dibenzoyl-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-N⁴-benzoylxytidin (có công thức 1) thu được theo phương pháp đã được bộc lộ trong WO 2006/031725 và WO 2008/045419, cả hai công bố đơn này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Hợp chất có công thức 1 được xử lý bằng dung dịch nước axit axetic 70% để tạo ra 3',5'-O-dibenzoyl-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-uridin (có công thức 2). Benzoyl este cũng có thể được thủy phân theo nhiều phương pháp, ví dụ, bằng alkoxit trong dung môi rượu, như natri metoxit trong metanol, kali cacbonat trong metanol, hoặc chất tương tự etanol, alkylamin như metylamin trong metanol, butylamin, v.v.. Amoni cacbonat trong metanol được chọn để xử lý ở quy mô lớn hơn. Sản phẩm uridin (có công thức 3) có thể được tinh chế bằng cách kết tinh để thu được hiệu suất 70% từ xytidin được tribenzoyl hóa (có công thức 1).

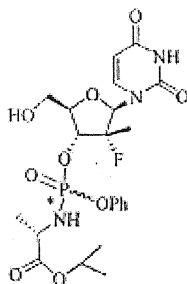
Nhiều quy trình trong các tài liệu kỹ thuật chuyên ngành bộc lộ chi tiết các quy trình và điều kiện khác nhau để tạo ra phosphoramidat bằng cách sử dụng vài lần đương lượng của các chất phản ứng. Ví dụ, xem bài báo: McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 3504-3515 và McGuigan et al. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7215. Ở quy mô làm việc, hiện chỉ có một ví dụ đã biết, đã được bộc lộ trong bài báo: Lehsten et al., *Org. Process Res. Dev.* 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). Trong tài liệu được trích dẫn này, các tác giả đã giới thiệu khái niệm "quy trình một nồi", trong đó muối clorua của axit amin và phenyl diclophosphat được cho phản ứng với N-metylimidazol trong diclometan. Sau đó, nucleosit được bổ sung vào để tạo ra hợp chất 5'-O-phosphoramidat mong muốn, mà trong trường hợp này sẽ tạo ra hợp chất có công thức

4. Tuy nhiên, quy trình Lehsten có một vài nhược điểm. Ví dụ, quy trình Lehsten sử dụng lượng dư của các chất phản ứng nhiều hơn cần thiết làm tăng chi phí và khó khăn ở bước tinh chế theo phương pháp sắc ký. Hơn thế nữa, Lehsten gợi ý rằng có thể kiểm soát mức độ chọn lọc của phản ứng theo 5'-hydroxyl hơn 3'-hydroxyl so với tài liệu được trích dẫn bằng cách sử dụng nhiệt độ thấp và bổ sung chậm nucleosit vào.



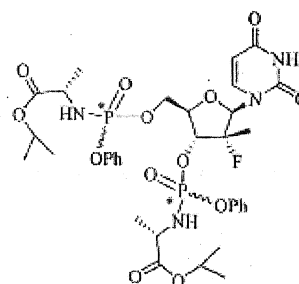
4

S'-O-phosphoramidat
(2 chất đồng phân
không đối quang)



5

3'-O-phosphoramidat (2
chất đồng phân không
đối quang)



6

3',5'-bis-O-phosphoramidat (4 chất
đồng phân không đối
quang)

Bằng cách áp dụng quy trình Lehsten đối với các hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này, tạo ra từ 1% đến 5% các chất đồng phân không đối quang 3'-O-phosphoramidat được thể một lần (có công thức 5) và từ 10% đến 30% sản phẩm được thể hai lần (có công thức 6). Vì độ phân cực của các chất đồng phân không đối quang 3' là tương tự với các chất đồng phân không đối quang 5' mong muốn (có công thức 4), nên việc tách theo phương pháp sắc ký là rất khó khăn. Việc nâng quy mô của quy trình là gần như không thể nếu không gạn phần đáng kể các chất đồng phân không đối quang 5' kém phân cực hơn (có công thức 4) hoặc chấp nhận nồng độ ô nhiễm cao của các chất đồng phân không đối quang 3' (có công thức 5). Ở quy mô ban đầu 50g, sản phẩm thu được chứa chất đồng phân không đối quang 3' (có công thức 5) nhiễm khoảng 3%, mà được rửa giải đồng thời với chất đồng phân không đối quang 5' kém phân cực hơn (có công thức 4).

Sáng chế còn đề xuất các điều kiện phản ứng sử dụng lượng chất phản ứng ít hơn và phương pháp loại bỏ một cách có chọn lọc các tạp chất của chất đồng phân không đối quang 3'-O-phosphoramidat (có công thức 5) để tách hơn theo phương pháp

sắc ký, bằng cách đó tạo ra các chất đồng phân không đối quang 5'-O-phosphoramidat mong muốn với độ tinh khiết cao hơn (có công thức 4).

Về hóa tỷ lượng chất phản ứng, đã thực hiện nghiên cứu, trong đó phép tính hệ số tỷ lượng của các chất phản ứng được thay đổi một cách có hệ thống và các kết quả được theo dõi theo phương pháp NMR phospho đối với hỗn hợp phản ứng thô như Lehsten đã thông báo. Trong các lần thực hiện thành công hơn, hiệu suất tách và độ tinh khiết của sản phẩm mong muốn được so sánh. Quan sát thấy rằng 5'-hydroxyl chính phản ứng ở tốc độ nhanh hơn 3'-hydroxyl phụ. Điều này tạo ra tình huống cạnh tranh giữa diễn tiến của phản ứng tiêu thụ tất cả các nucleosit ban đầu và chuyển hóa sản phẩm được thế một lần ở vị trí 5' và sản phẩm được thế một lần ở vị trí 3' (có công thức 4 và công thức 5) thành các sản phẩm được thế hai lần ở vị trí 5' và 3' (có công thức 6). Sản phẩm được thế một lần ở vị trí 3' chuyển hóa thành sản phẩm được thế hai lần ở tốc độ nhanh hơn sản phẩm được thế một lần ở vị trí 5', nên có thể giảm mức nhiễm chất đồng phân không đối quang 3' bằng cách thúc đẩy phản ứng về phía sản phẩm được thế hai lần. Tuy nhiên, với cách hữu hiệu để loại bỏ các chất đồng phân không đối quang 3', phản ứng có thể được tối ưu hóa để tạo ra nhiều chất đồng phân không đối quang 5' mong muốn hơn mà không cần phải hy sinh nhiều chất đồng phân không đối quang 5' chuyển hóa thành hợp chất được thế hai lần (có công thức 6). Cũng quan sát thấy rằng clorua của axit amin rất hút ẩm. Vì lượng nước bất kỳ có mặt sẽ tiêu thụ lượng tương đương chất phản ứng phenyl diclophosphat, cần chú ý giữ axit amin hầu như khan hoặc cần làm hầu như khan trước khi sử dụng. Một cách vắn tắt, Lehsten đã thông báo rằng tỷ lệ tối ưu giữa axit amin và phenyl diclophosphat và nucleosit lần lượt là 3,5:2,5:1. Đã phát hiện ra rằng tỷ lệ tối ưu giữa axit amin và phenyl diclophosphat và nucleosit bằng khoảng 1,6 : 1,3 : 1 là tối ưu trong các điều kiện mà chất đồng phân không đối quang 3' có thể được loại bỏ một cách hữu hiệu và clorua của axit amin hầu như là khan. Bằng cách sử dụng lượng nhỏ của các chất phản ứng, tiết kiệm được chi phí và đơn giản hóa được bước tác theo phương pháp sắc ký sản phẩm mong muốn ra khỏi các sản phẩm phụ phản ứng và ra khỏi các chất đồng phân không đối quang được thế hai lần ở nồng độ giảm.

Theo quy trình thay thế, chất dẫn xuất của hợp chất có công thức 3 có nguyên tử hydroxy ở vị trí 3' bị che khuất được điều chế bằng cách sử dụng nhóm che khuất t-

butyldimetylsilyl theo 2 bước. Sau đó, hợp chất này được chuyển hóa thành chất dẫn xuất 5'-phosphoramidat của nó. Mong muốn rằng lúc đó nhóm silyl có thể được loại bỏ và không có các chất đồng phân 3' (có công thức 5) hay các 3',5'-

bisphosphoramidat (có công thức 6). Cách thức tương tự đã được bộc lộ bởi Borch và Fries (patent Mỹ số 5,233,031) với tổng hiệu suất thấp đối với alkyl phosphoramidat.

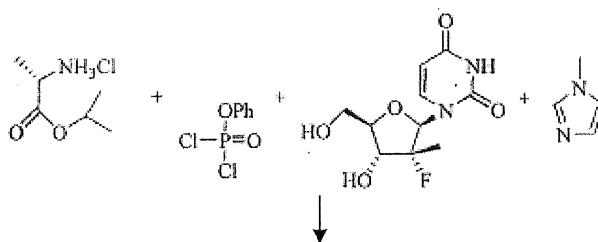
Hướng thay thế khác là áp dụng cách tổng hợp trực tiếp và sau đó áp dụng quy trình hóa học để giúp phân biệt tạp chất đồng phân không đối quang 3' có công thức 5 với chất đồng phân không đối quang 5' mong muốn có công thức 4 để dễ tách. Nhóm được mong muốn sẽ phản ứng một cách chọn lọc với nhóm hydroxyl bậc một tự do của tạp chất 3'-O-phosphoramidat có công thức 5 hơn là nhóm hydroxyl bậc hai tự do của 5'-O-phosphoramidat mong muốn có công thức 4. Còn mong muốn rằng nhóm che khuất làm thay đổi đáng kể độ phân cực của sản phẩm 3'-O-phosphoramidat bị che khuất ở nguyên tử O ở vị trí 5' tạo ra từ 5'-O-phosphoramidat mong muốn có công thức 4. Có lẽ không cần thêm bước nào nữa để loại bỏ nhóm che khuất vì chất đồng phân không đối quang 5' mong muốn có công thức 4 sẽ không thay đổi. Các chất đồng phân không đối quang 3' thay đổi về mặt hóa học sẽ làm dễ tách theo phương pháp sắc ký hoặc tách nhờ hỗ trợ làm sạch đặc biệt hoặc bằng cách chiết.

Đặc biệt, nhóm che khuất tert-butyldimetylsilyl (tBDMS) đáp ứng các tiêu chuẩn này và là nhóm đầu tiên được thể hiện và tiếp theo sử dụng ở quy mô kilogam. Trong các điều kiện nhất định như trong dung môi và bazơ là pyridin, nhóm tBDMS phản ứng với độ chọn lọc cao ở vị trí hydroxyl bậc một so với vị trí hydroxyl 3' bậc hai. Phản ứng phosphoramidat sử dụng N-metylimidazol (NMI) làm bazơ. Với sự có mặt của NMI, bước silyl hóa là kém chọn lọc hơn. Tốt hơn, nếu lượng NMI được giảm. Việc này có thể dễ dàng được thực hiện sau phản ứng phosphoramidat bằng cách rửa dung dịch phản ứng bằng dung dịch axit clohydric 1N. NMI và nucleosit ban đầu còn sót lại được loại bỏ, để lại hỗn hợp thô gồm các sản phẩm được thể một lần và hai lần và các sản phẩm phụ của phản ứng. Sau đó, nó được hòa tan trong pyridin và được cho phản ứng với tert-butyldimetylsilyl clorua. Sản phẩm được thể một lần ở vị trí 3' có công thức 5 được chuyển hóa trong vài giờ hoặc trong thời gian ngắn hơn thành 5'-O-tBDMS-3'-O-phosphoramidat có công thức 7. Diễn tiến của phản ứng này có thể được theo dõi theo phương pháp HPLC. Độ phân cực của sản phẩm có công thức 7 được

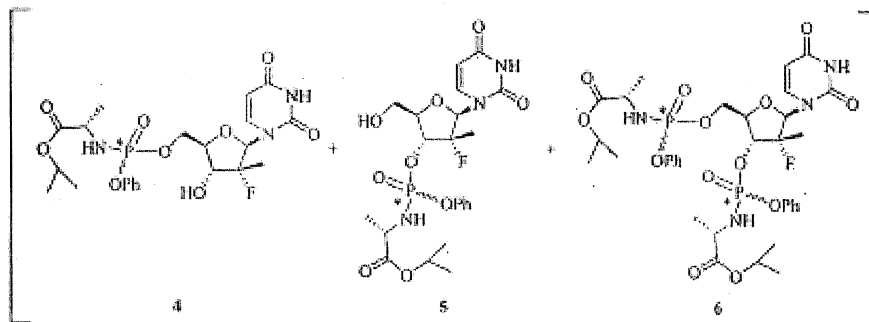
silyl hóa này là thấp hơn bis-phosphoramidat có công thức 6 và dễ dàng được loại bỏ theo phương pháp sắc ký. Bằng cách áp dụng phương pháp này, có thể làm giảm nồng độ của 3'-monophosphoramidat có công thức 5 đến dưới 0,1% sản phẩm 5' có công thức 4 so với 1% đến 3% nếu không xử lý bằng silyl. Tương tự, việc xử lý bằng dimetoxytriphenylmetyl clorua (DMT-Cl) trong các điều kiện như vậy cũng có hiệu quả tốt. Cũng dễ hơn trong việc xác định sản phẩm của phản ứng DMT theo phương pháp TLC vì DMT chứa các phân tử bắt màu da cam sáng khi được đun nóng hoặc khi tiếp xúc với axit. Còn có thể dự đoán nhiều nhóm che khuất khác, như nêu trên.

Cả các điều kiện phản ứng và việc tẩy tạp 3' đều là các phương pháp chung và có thể được áp dụng đối với hầu hết các nucleosit phosphoramidat có nhóm hydroxyl tự do ở đầu tận cùng 3'. Gốc phosphoramidat có thể kết hợp với este axit amin và rượu thơm. Gốc nucleosit có thể là nucleosit bất kỳ, trong đó 5' phosphoramidat tạo ra 5'-monophosphat và có thể được chuyển hóa tiếp thành dạng 5'-triphosphat.

Sơ đồ sau là sơ đồ phản ứng chính minh họa việc điều chế isopropyl L-alanat phenyl phosphoramidat của 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin với sản phẩm chính là 5'-O-phosphoramidat mong muốn (có công thức 4, hai chất đồng phân không đối quang) và sản phẩm phụ là 3'-O-phosphoramidat (có công thức 5, hai chất đồng phân không đối quang) và 3',5'-bis-O-phosphoramidat (có công thức 6, bốn chất đồng phân không đối quang). Các chất phản ứng này được bổ sung vào theo các tỷ lệ tỷ lượng như được bộc lộ trong phần phương pháp điều chế. Phản ứng được thực hiện đến khi còn sót lại khoảng 5% nguyên liệu ban đầu theo quan sát UV trên sắc ký lớp mỏng (thin layer sắc ký - TLC). Cả UPLC/MS cho thấy khoảng 10% 3',5' bis-phosphoramidat có công thức 6 đã được tạo ra so với sản phẩm 5' mong muốn. Sau khi làm nguội và xử lý bằng dung dịch nước axit, phần cặn thô từ lớp hữu cơ được chuẩn bị cho bước silyl hóa. Trong các điều kiện phản ứng đã được bộc lộ, nhóm silyl ưu tiên phản ứng với nhóm 5'-hydroxyl tự do của 3'-O-phosphoramidat để tạo ra hợp chất có công thức 7. Phản ứng này được tiếp tục cho đến khi không còn phát hiện thấy 3'-O-phosphoramidat theo UPLC/MS.



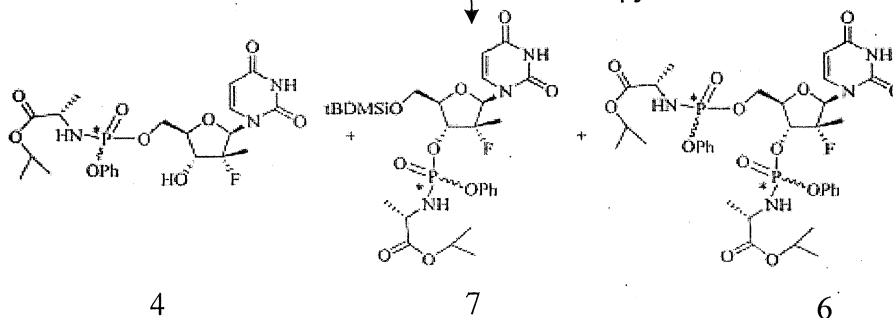
3



5'-O-phosphoramidat
(2 chất đồng phân không đối quang)

3'-O-phosphoramidat
(2 chất đồng phân không đối quang)

3',5'-bis-O-phosphoramidat
(4 chất đồng phân không đối quang)



3'-O-phosphoramidat-5'-O-tBDMS
(2 chất đồng phân không đối quang)

Sau khi tinh chế hỗn hợp phản ứng silyl hóa, sản phẩm mong muốn được đưa đến bước sắc ký trên silicagel và được rửa giải bằng gradien metanol trong diclometan (1% đến 4%). Chất 5'-monophosphoramidat có công thức 4 rửa giải ra cuối cùng.

Phương pháp điều chế

Ví dụ 1. Điều chế 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (có công thức 3)

3',5'-O-dibenzozy-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-N⁴-benzozylxtydin (500g, 0,874 mol) và dung dịch nước axit axetic 70% (7,5l) được bổ sung vào bình loại 10l. Dung dịch này được đun nóng để hồi lưu (110°C) trong 20 giờ. TLC cho thấy phản ứng hoàn thành (Rf 0,6 trong dung dịch 5% metanol trong diclometan (DCM)). Hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ môi trường và pha loãng bằng nước (2l). Sau khi khuấy trong 2 giờ, chất kết tủa thu được được gom bằng cách lọc và chất rắn được rửa bằng nước (5l) và để khô trong khí quyển ở nhiệt độ môi trường trong 12 giờ để tạo ra 360g (88%). Chất trung gian dibenzoyluridin này được sử dụng trực tiếp ở bước tiếp 5'-TBDMS 5'-TBDMS theo bằng cách bổ sung toàn bộ nó vào amoniac metanol mới được điều chế (5,4l, khoảng 25%) ở 0°C. Nhiệt độ này được duy trì trong 3 giờ và sau

đó nhiệt độ được nâng lên đến 15°C trong 24 giờ. TLC cho thấy phản ứng đã hoàn thành (Rf 0,4 trong dung dịch chứa 10% metanol trong DCM). Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua tầng Celite và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô (216g). Sản phẩm thô này được khuấy với etyl axetat (325ml) trong 3 giờ ở nhiệt độ môi trường. Chất rắn thu được được gom bằng cách lọc và rửa bằng etyl axetat (216ml). Chất rắn này được để khô trong chân không ở nhiệt độ môi trường trong 4 giờ để tạo ra 160g (78%) sản phẩm mong muốn với độ tinh khiết 98,7% theo HPLC. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 11,44 (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-1 259.

Ví dụ 2. 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-ylmetoxy]-phenoxy-phosphorylamino}-propionic (có công thức 4)

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 ba cổ loại 5l được trang bị thanh khuấy cơ, bể nước đá muối, nhiệt kế trong, và khí quyển nitơ. Bình này được nạp clorua của este L-alanin isopropyl (82,0g, 0,490mol) và diclometan khan (0,80l). Trong khi hỗn hợp này được khuấy, phenyl diclophosphat (85,0g, 0,40mol) được bổ sung vào một mẻ và khuấy. Trong khi duy trì nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ -5°C đến 5°C, dung dịch chứa N-metylimidazol (NMI, 250g, 3,07mol) trong diclometan (250ml) được bổ sung vào trong khoảng thời gian nửa giờ. Dung dịch này được phép khuấy trong 1 giờ trong khoảng nhiệt độ đó. 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyl-uridin (có công thức 3, 80,0g, 0,307mol) được bổ sung vào ở 0°C một lần và sau đó bình phản ứng được để ấm lên từ từ trong bể nước muối. Vào thời điểm 1 giờ, nhiệt độ bên trong tăng đến -2°C. TLC (5% metanol trong DCM) vào thời điểm 1 giờ cho thấy rằng hơn 50% nucleosit đã được tiêu thụ. Bể nước muối này được loại bỏ và bình phản ứng đạt đến nhiệt độ môi trường trong 1 giờ nữa. TLC sau tổng cộng 3 giờ và sau tổng cộng 5 giờ cho thấy 95% nucleosit ban đầu đã được tiêu thụ. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng cách bổ sung metanol (100ml) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 5 phút.

Hỗn hợp phản ứng này được rửa bằng dung dịch HCl 1N (2 X 500ml), tiếp theo bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa (2 X 500ml). Lớp hữu cơ phân tách được làm khô trên natri sulfat khan (50g) và lọc. Dung dịch này được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và sau đó trong điều kiện chân không cao đến khô để tạo ra sản phẩm thô ở dạng dầu nhớt (170g). Thu được NMR của sản phẩm thô (^{31}P và ^1H). ^{31}P -NMR cho thấy kết hợp khoảng 1% tổng lượng phospho là do sự có mặt của chất đồng phân 3' có công thức 5.

Pyridin khan (1700ml) được bổ sung vào sản phẩm thô. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và sau đó trong điều kiện chân không cao nhằm giảm lượng nước của hỗn hợp thô nhờ làm bay hơi đồng thời. Dầu thu được được hòa tan lại trong pyridin khan (500ml) và sau đó được bổ sung vào lượng dư t-butyl-dimethylsilyl clorua (9,0g, 60mM). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường. Diễn tiến của phản ứng được theo dõi theo UPLC/MS. Sau 3 giờ, tạp chất 3' có công thức 5 không còn phát hiện được và hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng cách bổ sung metanol (50ml) vào.

Hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm thành dầu. Cặn này được hòa tan trong etyl axetat (1,5l) và rửa bằng dung dịch HCl 1N (2X 500ml), tiếp theo bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa (2 X 500ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan (50g), lọc và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô ở dạng dầu màu vàng nhạt.

Dầu thô được pha loãng bằng cùng thể tích diclometan và nạp vào hộp silicagel 2,5kg theo mô đun nén theo hướng kính ở áp suất khí quyển 100psi (690 KPa). Bằng cách sử dụng bơm gradien ở áp suất 60 psi (414 KPa) và lưu tốc 400ml/phút, hộp này được rửa bằng metylen clorua (4l) tiếp theo bằng gradien chứa 1% - 4% metanol trong metylen clorua (48l). Phần lớn tạp chất chính (di-(isopropylalanyl)phenyl phosphat, 3',5'-bis phosphoramidat (có công thức 6), sản phẩm cộng 3'-phosphoramidat-5'-TBDMS (có công thức 7)) được rửa giải bằng gradien ~3%. Sản phẩm mong muốn được rửa giải bằng lượng 3% đến 4% metanol. Sản phẩm chứa các phân đoạn được phân loại thành hai mẻ. Mẻ thứ nhất chứa lượng nhỏ tạp chất trên và mẻ thứ hai là sản phẩm tinh khiết. Nhóm phân đoạn thứ nhất chứa lượng nhỏ của tạp chất kém phân cực hơn (tạp chất trên) như 3',5'-bis phosphoramidat và di-alanylphenyl phosphat và chủ

yếu là chất đồng phân không đối quang R_p và cần bước tinh chế cột thứ hai. (Thuật ngữ tương đối, trên và dưới chỉ việc rửa giải trên sắc ký silicagel pha thuận, trong đó "chất đồng phân trên" có nghĩa là chất đồng phân rửa giải ra đầu tiên). Nhóm phân đoạn thứ hai không chứa lượng đáng kể tạp chất - chỉ phân R_p còn sót lại và chủ yếu là chất đồng phân không đối quang S_p . Sau đó, nó được kết hợp lại với các phân đoạn sắc ký cột hai lần. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và bột màu trắng thu được được làm khô tiếp (0,20mmHg (26,6644Pa)) trong 1 giờ để tạo ra 42g mẻ tạp chất (chất đồng phân trên và chất đồng phân dưới theo tỷ lệ 4:1 theo ^{31}P -NMR) và 38g mẻ chất tinh khiết (chất đồng phân trên và chất đồng phân dưới theo tỷ lệ 1:3). Mẻ tạp chất được sắc ký cột lại theo cách tương tự để tạo ra 3,8g chất đồng phân trên tinh khiết 97% (phân đoạn để riêng) và 36g sản phẩm tinh khiết theo tỷ lệ 4:1. Hai mẻ chính được hòa tan trong DCM, kết hợp, làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm và làm khô (50°C, 0,2mmHg (26,6644Pa), 24 giờ) để thu được 74g (45,7%) sản phẩm tinh khiết có công thức 4 với chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ bằng 48:51, ở dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 75°C đến 85°C.

Nhằm tạo ra hỗn hợp chất đồng phân không đối quang ở dạng rắn vô định hình, 74g bột màu trắng được khuấy vào cùng với t-butyl methyl ete (750ml) mà tạo ra dung dịch riêng phần và cặn rắn dính. Trong khi khuấy, heptan (750ml) được bổ sung từ từ vào và huyền phù này được khuấy bằng cách cơ học trong 1 giờ cho đến khi phần lớn gồm được chuyển hóa thành chất rắn màu trắng. Chất rắn này được cạo ra bằng dao phết và huyền phù đặc thu được được lọc. Chất rắn này được rửa bằng heptan (4 x 50ml) và làm khô trong chân không (50°C, 0,2mmHg (26,6644Pa), 24 giờ) để tạo ra bột màu trắng vô định hình (64g) với nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng rộng từ 70°C đến 80°C. ^1H và ^{31}P NMR theo cấu trúc và HPLC cho thấy độ tinh khiết bằng 99,8% với tỷ lệ chất đồng phân không đối quang bằng 46:54 (cũng đã được xác nhận theo ^{31}P NMR).

Phương pháp khác để tạo ra hỗn hợp rắn gồm hợp chất có công thức 4. Sau khi sắc ký, cặn được làm bay hơi cùng với diclometan hai lần (5ml/g) và làm khô trong 24 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 40°C áp suất nằm trong khoảng từ 35mTorr (4,6662Pa) đến 45mTorr (5,9995Pa). Cặn bột được rây qua rây có cỡ lỗ 250micron và làm khô tiếp trong các điều kiện như vậy cho đến khi lượng diclometan

còn sót lại xuống dưới 400ppm như đo được bằng sắc ký khí không gian đầu. Bột vô định hình màu trắng đục đến trắng thu được có nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh nằm trong khoảng từ 53,7°C đến 63,5°C.

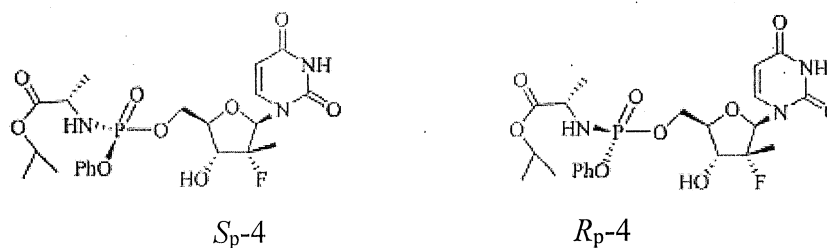
Xác định tính chất của hỗn hợp gồm các chất đồng phân (có công thức 4): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 10,05 (br s, 1H, NH, S_p), 10,00 (br s, 1H, NH, R_p), 7,49 (d, 1H, C6-H, S_p), 7,36 (m, 5H, C6-H, R_p , thom), 7,23-7,14 (m, 6H, R_p/S_p , thom), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, R_p/S_p), 5,63 (d, 1H, C5-H, S_p), 5,58 (d, 1H, C5-H, R_p), 5,01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂, R_p/S_p), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_p/S_p), 4,12 (m, 2 H, ala-CH-CH₃, R_p/S_p), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R_p/S_p), 1,39-1,22 (m, 12H, toàn bộ CH₃, R_p/S_p).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3) δ 3,60 (R_p), 3,20 (S_p) so với triphenylphosphat ở -17,80ppm. ES-MS M+1 530,2. Phân tích nguyên tố: Theo tính toán % (kể cả 0,29% nước như đo được theo phân tích Karl Fisher) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84. Theo thử nghiệm %: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Bàn luận về việc tách các chất đồng phân

Do tính không đối xứng gương ở nguyên tử phospho, hợp chất có công thức 4 gồm hai chất đồng phân không đối quang, được ký hiệu là S_p -4 và R_p -4. Chỉ định hóa học lập thể được thực hiện dựa trên phân tích tia X đối với tinh thể đơn nhất của hợp chất có công thức S_p -4. Cả hợp chất có công thức R_p -4 và S_p -4 đều tạo ra sản phẩm dạng tinh thể.

Các quy trình để kết tinh được bộc lộ dưới đây.



Ví dụ 3. Kết tinh chất đồng phân có công thức R_p -4. Phân đoạn đã được sắc ký chứa chất đồng phân có công thức R_p -4 rửa giải ra đầu tiên, kém phân cực hơn (3,8g, tinh khiết 97%) được hòa tan trong isopropanol (36g) và pha loãng bằng heptan cho đến khi trở nên đục (72g). Dung dịch này được tạo mầm kết tinh và khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 5 giờ. Chất rắn thu được được gom bằng cách lọc trong chân không, rửa bằng heptan (2x20ml) và làm khô (50°C, 0,2mm, 24 giờ) để tạo ra 2,3g tinh thể hình

kim màu trắng rất nhỏ, nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 136,2°C đến 137,8°C. Độ tinh khiết theo phân tích HPLC của hợp chất thu được là 99,02%.

Hợp chất có công thức R_p-4 : $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9,10 (br s, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, thơm ở vị trí *o*), 7,26-7,16 (m, 4 H, C6-H, thơm ở vị trí *m*, *p*), 6,16 (br d, 1H, C1'-H), 5,58 (d, 1H, C5-H), 5,01 (sept, 1H, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 4,52-4,47 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,10 (d, 1H, C3'-H), 4,02-3,76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 1,37-1,20 (m, 12H, toàn bộ là CH₃).

Ví dụ 4. Điều chế và kết tinh hợp chất có công thức S_p-4

Phương pháp 1: Làm kết tủa trực tiếp từ hợp chất có công thức 4 thô: phenydiclophosphat (7,5ml, 50mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa L-alanin isopropyl clorua của este (10,5g, 61,5mmol, được làm khô theo cách đồng sôi, hai lần, mỗi lần bằng 50ml toluen) trong diclometan (100ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được làm lạnh đến -10°C và sau đó được bổ sung vào dung dịch chứa NMI (30,5ml, 384,3mmol) trong 30ml diclometan trong thời gian 30 phút. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến -15°C trong 1 giờ. 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (có công thức 3) (10g, 38,4mmol) được bổ sung một mẻ vào hỗn hợp nêu trên và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ thấp hơn -10°C trong 3 giờ và sau đó được nâng nhiệt độ từ từ đến 20°C (6 giờ). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó qua đêm (15 giờ) và sau đó làm nguội bằng 10ml metanol. Dung môi được làm bay hơi và cặn được hòa tan lại trong EtOAc (200ml). Lớp EtOAc được rửa bằng nước (100ml), dung dịch HCl 1N (3x75ml), dung dịch nước NaHCO₃ 2% (50ml) và nước muối (50ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc và cô. Cặn được làm khô trong chân không cao trong 2 giờ để tạo ra bột màu trắng (22g).

Bột nêu trên được hòa tan trong 33ml DCM và sau đó được bổ sung vào 65ml IPE (isopropyl ete) để tạo ra dung dịch bão hòa. Dung dịch này được lọc qua đệm mỏng Celite và dịch lọc này được khuấy với mầm kết tinh hợp chất có công thức S_p-4 trong 72 giờ ở nhiệt độ môi trường (khoảng 22°C - lưu ý rằng việc làm lạnh huyền phù này đến 0°C làm chảy dầu ra khỏi sản phẩm thô). Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng IPE (20ml) và làm khô để tạo ra 4,58g bột màu trắng (hỗn hợp gồm hợp chất có công thức S_p-4 : R_p-4 có tỷ lệ ~85:15 như lần lượt xác định được theo ^{31}P NMR). Chất

rắn này được tạo huyền phù trong 23ml DCM và tiếp đó hồi lưu trong 3 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 15 giờ. Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng 4,5ml DCM lạnh và làm khô trong chân không cao ở 45°C để tạo ra hợp chất có công thức S_p-4 tinh khiết, nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 93,9°C đến 104,7°C, độ tinh khiết theo phân tích HPLC 99,74% (3,11g, 15,2% uridin nucleosit).

Hợp chất có công thức S_p-4 : $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8,63 (br s, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, thơm ở vị trí *o*), 7,26-7,18 (m, 3H, thơm ở vị trí *m,p*), 6,18 (br d, 1H, C1'-H), 5,70 (d, 1H, C5-H), 5,02 (sept, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 4,53 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-OH, C4'-H, ala- $\text{CH}-\text{CH}_3$), 3,77 (br s, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'- CH_3), 1,37 (d, 3H, ala- CH_3), 1,24 (d, 6H, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$).

Phương pháp 2: Cho chảy dầu ra khỏi hợp chất có công thức 4 thô: phenydiclophosphat (14,9ml, 100mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa clorua của este L-alanin isopropyl (20,6g, 123mmol, được làm khô theo cách đồng sôi, hai lần, mỗi lần với 75ml toluen) trong diclometan (200ml) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được làm lạnh đến -10°C và sau đó được bổ sung vào dung dịch chứa NMI (61,3ml, 769mmol) trong 60ml diclometan trong khoảng thời gian 30 phút. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến -15°C trong 1 giờ. 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (có công thức 3) (20g, 76,9mmol) được bổ sung vào hỗn hợp đó một mẻ và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ thấp hơn -10°C trong 3 giờ và sau đó nâng nhiệt độ từ từ đến 20°C (6 giờ). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó qua đêm (15 giờ) và sau đó làm nguội bằng 10ml metanol. Dung môi được làm bay hơi và cặn được hòa tan lại trong EtOAc (400ml). Lớp EtOAc được rửa bằng nước (200ml), dung dịch HCl 1N (3x100ml), dung dịch nước NaHCO_3 2% (100ml) và nước muối (50ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô. Cặn được làm khô trong chân không cao trong 2 giờ để tạo ra bột màu trắng (43g). Bột này được hòa tan trong 86 ml EtOAc trong bình đáy tròn hai cổ có lắp thanh khuấy cơ. Trong khi khuấy, 100ml heptan được bổ sung từ từ vào và huyền phù này được khuấy trong 1 giờ. Lớp trên cùng được gạn và cặn được khuấy lại cùng với 50ml các dung dịch EtOAc/heptan theo tỷ lệ 2:3 trong 10 phút và sau đó gạn. Cặn được làm khô trong chân không cao để tạo ra bột màu trắng (31g).

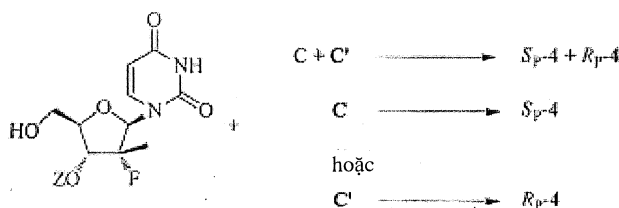
Bột nêu trên được hòa tan trong 46ml DCM và sau đó được bổ sung vào 95ml IPE để tạo ra dung dịch bão hòa. Dung dịch này được lọc qua đệm mỏng Celite và dịch lọc được khuấy với mầm kết tinh S_p-4 trong 72 giờ ở nhiệt độ môi trường. Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng IPE (30ml) và làm khô để tạo ra 7,33g (hỗn hợp gồm hợp chất có công thức $S_p-4 : R_p-4$ theo tỷ lệ ~85:15 như lần lượt xác định được theo ^{31}P NMR) bột màu trắng. Chất rắn này được tạo huyền phù trong 36ml DCM và tiếp đó hồi lưu trong 3 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 15 giờ. Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng 7,5ml DCM lạnh và làm khô trong chân không cao ở 45°C để tạo ra hợp chất có công thức S_p-4 tinh khiết >99%, (4,78g, 11,6% từ uridin nucleosit).

Phương pháp 3: nạp hợp chất có công thức 4 thô lên silicagel: 5,0g hợp chất có công thức 4 thô điều chế được theo cùng cách như hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang ngay trước khi bắt đầu sắc ký cột với khoảng 2,5g 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (có công thức 3). Hợp chất thô được hòa tan trong 10ml DCM và 10g silicagel được bổ sung vào dung dịch này. Dung môi được làm bay hơi để tạo ra huyền phù đặc khô. Huyền phù đặc này được khuấy với 40ml EtOAc/hexan 50% trong 15 phút và sau đó được lọc. Silicagel được rửa bằng 10ml EtOAc/hexan 50% nữa. Sau đó, silicagel được rửa bằng dung dịch chứa 15% MeOH/DCM (100ml) và được gom riêng rẽ. Dung môi được làm bay hơi và làm khô trong chân không cao để tạo ra 4,0g cặn (bột). Cặn này được hòa tan trong DCM (6ml) và sau đó được bổ sung vào ~9ml IPE để tạo ra dung dịch bão hòa. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy nhẹ qua đệm với mầm kết tinh S_p-4 ở nhiệt độ môi trường. Chất rắn màu trắng được lọc và rửa bằng IPE (5ml) để tạo ra 1,28g sản phẩm. ^{31}P NMR cho thấy rằng sản phẩm nêu trên chứa hỗn hợp lần lượt gồm hợp chất có công thức $S_p-4 : R_p-4$ theo tỷ lệ 77:23. Hỗn hợp này được kết tinh lại ra khỏi 20ml DCM để thu 0,75g hợp chất có công thức S_p-4 tinh khiết >99% (khoảng 12% từ uridin nucleosit). Phương pháp này điều chế hợp chất có công thức S_p-4 không cần đến bước silyl hóa như đã được thực hiện đối với hỗn hợp, nên toàn bộ quy trình phản ứng được thể hiện nêu trên. Các khía cạnh về các dạng tinh thể đơn và dạng đa hình của hợp chất có công thức S_p-4 được thể hiện dưới đây.

Phương pháp 4: 40,0g hỗn hợp gồm hợp chất có công thức 4 theo tỷ lệ 1:1 được hòa tan trong 90ml diclometan. Diisopropylete (70ml) được bổ sung vào dung dịch này

để tạo ra dung dịch bão hòa. (Lượng diisopropyl ete có thể thay đổi dựa trên độ tinh khiết của sản phẩm). Dung dịch này được tạo mầm kết tinh với S_p -4 tinh khiết (> 99%) và hỗn hợp này được khuấy nhẹ bằng thanh khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ (sự tạo thành chất rắn được quan sát thấy sau 2 giờ). Chất rắn này được lọc, rửa bằng 40ml hỗn hợp gồm diisopropylete/diclometan (theo tỷ lệ 1:1) và làm khô để tạo ra chất rắn màu trắng (16,6g hợp chất có công thức S_p -4, độ tinh khiết 89,35% theo NMR). Chất rắn này được tạo huyền phù trong 83ml diclometan và hồi lưu trong 3 giờ. Huyền phù này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Chất rắn này được lọc và rửa bằng 10ml DCM lạnh. Chất rắn này được làm khô trong chân không để tạo ra hợp chất có công thức S_p -4 (13,1g, độ tinh khiết 99,48% theo phương pháp HPLC). 11g chất rắn này được hòa tan lại trong 330ml DCM trong điều kiện nóng. Dung dịch này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và để ở nhiệt độ này qua đêm. Sản phẩm ở dạng tinh thể được lọc và làm khô để tạo ra 10,5g hợp chất có công thức S_p -4 (99,74% theo phương pháp HPLC).

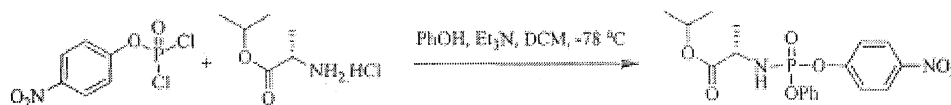
Các hợp chất có công thức S_p -4 và R_p -4 có thể được điều chế theo cách khác, theo phương án thứ chín hoặc phương án thứ mười, bằng cách cho nucleosit (được bảo vệ hoặc không được bảo vệ) có công thức 3 phản ứng với isopropyl-alanyl-phosphoramidat (hỗn hợp gồm C và C', C hoặc C'), như được thể hiện theo phương trình phản ứng sau.



P.D. Howes và các đồng tác giả, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes") bộc lộ 2'-phosphoramidat và 5'-phosphoramidat thu được bằng phản ứng với t-butylmagie clorua. Trong bài báo này, Howes bộc lộ rằng nếu 3'-deoxy-xytidin nucleosit được cho phản ứng với metyl este của axit (S)-2-[clo-phenoxy-phosphorylamino] propionic với sự có mặt của 1,2 đương lượng t-butylmagie clorua, thì xảy ra sự phosphoryl hóa chọn lọc ở vị trí 2', nhưng với đương lượng bổ sung của t-butylmagie clorua thì sẽ xảy ra sự phosphoryl hóa chọn lọc

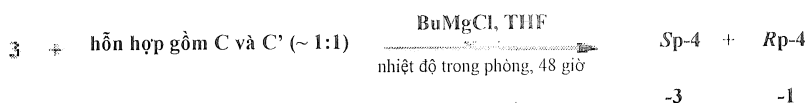
ở vị trí 5'. Sự bộc lộ này có lẽ là trái với sự bộc lộ trên Sơ đồ 1 trong bài báo của Howes.

Ví dụ 5-1. Điều chế isopropyl este của axit (S)-2-[(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic



Dung dịch chứa phenol và triethylamin (7,7ml, 55mmol) trong diclometan (100ml) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 4-nitrophenyl phosphorodichloridat 12,8g, 50mmol) trong diclometan (100ml) ở -78°C trong khoảng thời gian 20 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó trong 30 phút và sau đó chuyển sang bình đáy tròn khác chứa clorua của este L-alanin isopropyl (8,38g, 50mmol) trong diclometan (100ml) ở 0°C. Phần thứ hai triethylamin (14,6ml, 105mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 1 giờ và sau đó dung môi được làm bay hơi. Cặn được nghiền cùng với etyl axetat (150ml) và chất rắn màu trắng được lọc bỏ. Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng nhạt. Hợp chất thô được sắc ký bằng cách sử dụng gradien 0% - 20% etyl axetat/hexan để tạo ra sản phẩm (17g, hiệu suất 83%) ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ khoảng 1:1. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,31, -0,47; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,31-8,27 (m, 2H), 7,51-7,37 (m, 4H), 7,27-7,19 (m, 3H), 6,70-6,63 (m, 1H), 4,85-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,21-1,19 (m, 3H), 1,11-1,09 (m, 6H); MS (ESI) *m/z* 407 (M-1)⁺. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -2,05, -2,10; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,22 (d, J = 9,2Hz, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88 (m, 1H), 1,38 (d, J = 6,8Hz, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 & 3,0Hz, 6H); MS (ESI) *m/z* 407 (M-1)⁺.

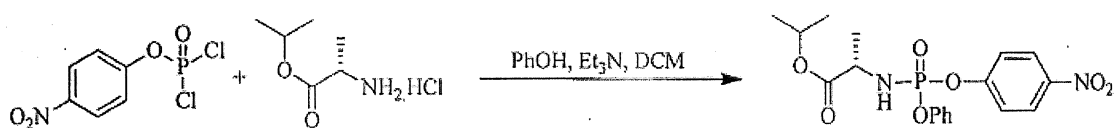
Ví dụ 5-2. Điều chế hợp chất có công thức S_p-4/R_p-4.



Dung dịch chứa 1,0M tert-butylmagie clorua (1,05ml, 1,05mmol, 2,1 đương lượng)) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion

(130mg, 0,5mmol) trong THF khan (1,5ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 5 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (hỗn hợp gồm các chất đồng phân theo tỷ lệ 1:1, 408mg, 1mmol) trong THF (1,5ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 5 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 48 giờ và sau đó được làm nguội bằng dung dịch nước NH₄Cl bão hòa (20ml). Hỗn hợp này được phân bố giữa etyl axetat (50ml) và nước (20ml). Chiết xuất hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra cặn màu vàng nhạt. Bước sắc ký cột đối với cặn bằng cách sử dụng gradien 0% - 2% MeOH/diclometan tạo ra chất rắn dạng bột màu trắng (125mg, hiệu suất 47%, hỗn hợp gồm hợp chất có công thức *S_p-4/R_p-4* theo tỷ lệ khoảng 3,05:1,0).

Ví dụ 6. Điều chế và tách không theo phương pháp sắc ký isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitro-phenoxy)phenoxy-phosphorylamino]propionic



Clorua của este L-alanin isopropyl (330g, 1,97mol) được làm khô một cách sơ bộ bằng cách đồng bay hơi với toluen (2 x 400ml) trong điều kiện áp suất giảm và sau đó làm khô trong lò chân không (50°C, 0,2mmHg (26,6644Pa), 17 giờ). Dung dịch chứa phenol (183,8g, 1,953mol) và trietylamin (300ml, 2,15mol) trong diclometan (900ml) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 4-nitrophenyl phosphorodichloridat (500,0g, 1,953mol) trong diclometan khan (3,0l) ở nhiệt độ bên trong -60°C trong khoảng thời gian 3 giờ. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó trong 30 phút nữa và sau đó nâng nhiệt độ đến -5°C trong 2,5 giờ. Este của axit amin đã được làm khô sơ bộ được bổ sung vào ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến 0°C trong khí quyển nitơ trong 10 phút. Cặn muối của aminoeste trong bình nạp liệu bổ sung được đưa vào hỗn hợp phản ứng thông qua bước rửa bằng diclometan (2 x 100ml). Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 40 phút và phần thứ hai trietylamin (571ml, 4,10mol) được bổ sung vào trong khoảng thời gian 40 phút ở 0°C. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C trong 3 giờ và tiếp đó chất rắn màu trắng (trietylamin hydroclorua) được lọc bỏ và rửa bằng diclometan (3 x

300ml). Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn được nghiền cùng với methyl t-butyl ete (MTBE, 4l). Thêm muối rắn đã được tạo ra bằng cách đó được lọc bỏ và rửa bằng MTBE (3 x 150ml). Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu trong màu nâu nhạt. Cặn này được làm bay hơi cùng với hexan (2 x 140ml) để loại bỏ MTBE còn sót lại bất kỳ và làm khô tiếp trong chân không ở 40°C trong 2 giờ. Cặn khô được trộn với diisopropyl ete (IPE, 1,1l) và khuấy ở 5°C trong bể nước đá. Lượng nhỏ mầm tinh thể của chất đồng phân S_p mong muốn của sản phẩm được bổ sung vào dung dịch và hỗn hợp này được khuấy ở 5°C trong hơn 22 giờ để tạo ra huyền phù đặc vừa phải. Huyền phù này được để yên trong máy lạnh (-10°C) trong 44 giờ. Sản phẩm kết tủa được gom bằng cách lọc và rửa bằng các dung môi trộn lẫn được làm lạnh sơ bộ gồm IPE và hexan (theo tỷ lệ 1:1, 3 x 190ml). Chất rắn này được làm khô trong chân không (0,5mm Hg (66,661Pa)) ở nhiệt độ môi trường đến khi đạt được khối lượng không đổi để tạo ra 227,23g (hiệu suất: 28,5%) ở dạng bột rắn màu trắng. Tỷ lệ hai chất đồng phân không đối quang $S_p:R_p$ bằng 9,65/1 theo ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6 , δ -0,31 (S_p), -0,47). Sản phẩm này được kết tinh lại bằng cách hòa tan trong IPE (840ml) trong khi đun nóng trong bể ở nhiệt độ 60°C. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó lượng nhỏ mầm kết tinh của chất đồng phân S_p được bổ sung vào. Bột rắn màu trắng được tạo ra trong 2 giờ và bình này được bảo quản trong máy lạnh (-10°C) trong 16 giờ. Chất rắn dạng tinh thể mịn màu trắng thu được được lọc, rửa bằng IPE đã được làm nguội sơ bộ (3 x 50ml) và làm khô trong chân không (môi trường, 0,5mmHg (66,661Pa)) đến khối lượng không đổi để tạo ra chất rắn mịn màu trắng (177,7g, tổng hiệu suất 22% hoặc tổng hiệu suất 44% theo hiệu suất lý thuyết của chất đồng phân S_p) với tỷ lệ chất đồng phân không đối quang bằng 48/1 theo ^{31}P -NMR. Nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 62°C đến 66°C.

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0,31; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49(d, $J=8,8\text{Hz}$, 2H), 7,41-7,37 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, $J=13,6, 10,0\text{Hz}$, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, $J=7,2\text{Hz}$, 3H), 1,10(d, $J=6,4\text{Hz}$, 6H);

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -2,05; (162 MHz, DMSO- d_6): δ -0,31; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,22 (d, $J=9,2\text{Hz}$, 2H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,26-7,18 (m,

3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88(m, 1H), 1,38 (d, J=6,8Hz, 3H), 1,22 (dd, J=6,2 & 3,0Hz, 6H); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49 (d, J=8,8Hz, 2H), 7,41 -7,37 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, J=13,6, 10,0Hz, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, J=7,2Hz, 3H), 1,10(d, J=6,4Hz, 6H)

MS (ESI) *m/z* 407 (M-1)⁺.

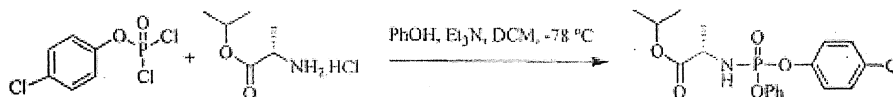
Hóa học tỷ lượng của hợp chất có công thức 8 (chất đồng phân *S_p*) đã được xác nhận bởi phân tích tinh thể học tia X đối với tinh thể đơn nhất, xem chi tiết dưới đây.

Ví dụ 7. Tách hỗn hợp chất đồng phân không đối quang isopropyl este của axit (S)-2-[(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic theo SFC

Mẫu hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang (4,8g) được làm giàu chất đồng phân *R_p* được xử lý theo phương pháp sắc ký lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid sắc ký – SFC) bằng cách sử dụng cột ChiralPak AD-H (2x15 cm) và rửa giải bằng 35% isopropanol trong cacbon dioxit ở áp suất 100 bar (10⁷Pa). Thực hiện việc nạp bằng cách phun 4ml mẫu ở nồng độ 17mg/ml metanol. Chất đồng phân *R_p* [isopropyl este của axit (S)-2-[(R)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino]propionic] được rửa giải trước tiên. Các phân đoạn thích hợp của nhiều lần rửa giải được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 2,9g chất đồng phân *R_p* [isopropyl este của axit (S)-2-[(R)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic] ở dạng dầu nhớt màu vàng nhạt và 1,9g chất đồng phân *S_p* [isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitro- phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic] ở dạng rắn màu trắng. Dữ liệu phân tích chất đồng phân *R_p* là tương tự với sản phẩm được tách theo phương pháp kết tinh nêu trên.

Dữ liệu phân tích đối với isopropyl este của axit (S)-2-[(R)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (có công thức 8, chất đồng phân *R_p*): ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ -0,47; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,46-7,38 (m, 4H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,68 (dd, J=13,8, 10,2Hz, 1H), 4,86-4,77 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,20 (d, J=7,2Hz, 3H), 1,10 (dd, J=6,2, 2,2Hz, 6H); MS (ESI) *m/z* 407 (M-1)⁺.

Ví dụ 8-1. Điều chế isopropyl este của axit 2-[(4-clo-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic triệt quang (±):

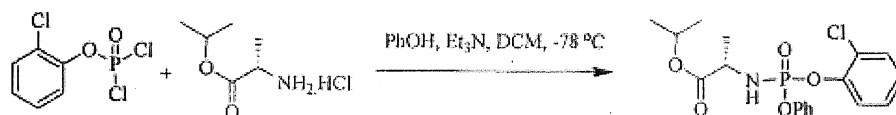


Dung dịch chứa phenol (0,94g, 10mmol) và trietylamin (1,56ml, 11mmol) trong diclometan (20ml) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 4-clo-phenyl phosho-rodicloridat (2,45g, 10,0mmol) trong diclometan (20ml) ở -78°C trong khoảng thời gian 20 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó trong 30 phút và sau đó chuyển sang bình đáy tròn khác chứa clorua của este L-alanin isopropyl (1,67g, 10mmol) trong diclometan (50ml) ở 0°C . Mẽ trietylamin thứ hai (2,92ml, 21mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 1 giờ và sau đó dung môi được làm bay hơi. Cặn được nghiền cùng với etyl axetat (30ml) và chất rắn màu trắng được lọc bỏ. Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng nhạt. Hợp chất thô được sắc ký bằng cách sử dụng gradien 10% - 20% etyl axetat/hexan để tạo ra sản phẩm (2,0g, hiệu suất 50%) ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ khoảng 1:1. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -1,58, -1,62; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,06-7,51 (m, 8H), 7,15-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47 (m, 2H), 4,0-4,10 (m, 1H), 3,82-3,88 (m, 3H), 1,35-1,36 (dd, 6H); 1,19-1,22 (m, 3H). MS (ESI) m/z 398 (M-1)⁺. Sản phẩm thu được được tinh chế bằng cách chiết, kết tinh, hoặc sắc ký, như nêu trên.

Ví dụ 8-2. Điều chế (S)-isopropyl 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)-phosphorylamino)propanoat (có công thức 4).

Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (12,4ml, 21mmol, 2,1 đương lượng)) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion (có công thức 3, 2,6g, 10mmol) trong THF khan (50ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 15 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (2-[(4-clo-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic triệt quang (4,08g, 10mmol) trong THF (15ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 10 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 72. TLC đồng điểm với sản phẩm thực cho thấy khoảng 5% sản phẩm mong muốn đã được tạo ra so với nucleosit ban đầu.

Ví dụ 9-1. Điều chế isopropyl este của axit 2-[(2-clo-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic triệt quang (\pm).



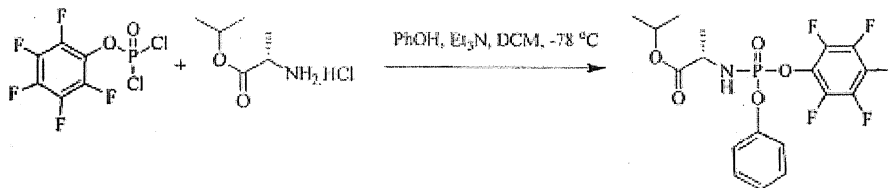
Dung dịch chứa phenol (3,76g, 40mmol) và trietylamin (6,16ml, 44mmol) trong diclometan (80ml) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 2-clo-phenyl phoshodichloridat (9,8g, 40mmol) trong diclometan (80ml) ở -78°C trong khoảng thời gian 20 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó trong 30 phút và sau đó chuyển sang bình đáy tròn khác chứa isopropyl clorua của este L-alanin (6,7g, 40mmol) trong diclometan (150ml) ở 0°C . Phần trietylamin thứ hai (11,6ml, 84mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 1 giờ và sau đó dung môi được làm bay hơi. Cặn được nghiền cùng với etyl axetat (100ml) và chất rắn màu trắng được lọc bỏ. Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng nhạt. Hợp chất thô được sắc ký bằng cách sử dụng gradien 10% - 20% etyl axetat/hexan để tạo ra sản phẩm (11,3g, hiệu suất 72%) ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ khoảng 1:1. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -1,58, -1,61; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,06-7,51 (m, 8H), 5,02-5,94 (m, 1H), 4,10-4,16 (m, 1H), 3,31-3,94 (m, 1H), 1,18-1,35(m, 3H), 1,38-1,40 (dd, 6H); MS (ESI) m/z 398 ($\text{M}-1$) $^+$. Sản phẩm thu được được tinh chế bằng cách chiết, kết tinh, hoặc sắc ký, như nêu trên.

Ví dụ 9-2. Điều chế (S)-isopropyl 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-flo-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)-phosphorylamino)propanoat.

Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (12,4ml, 21mmol, 2,1 đương lượng)) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion (có công thức 3, 2,6g, 10mmol) trong THF khan (50ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 15 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (2-[(2-clo-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (triệt quang, 4,08g, 10mmol) trong THF (15ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 10 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 72 giờ. TLC đồng điểm với sản phẩm

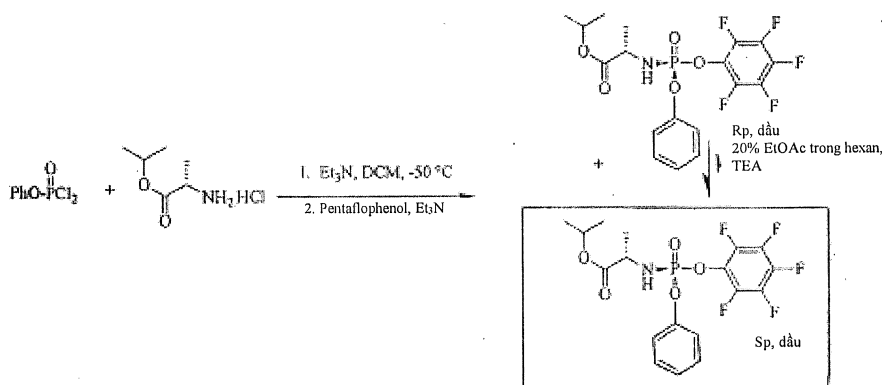
thực cho thấy khoảng từ 5% đến 10% sản phẩm mong muốn đã được tạo ra so với nucleosit ban đầu.

Ví dụ 10-1. Điều chế isopropyl este của axit 2-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic triệt quang (\pm).



Dung dịch chứa phenol và triethylamin (3,08ml, 22mmol) trong diclometan (40ml) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa pentafluorophenyl phosphorodichloridat (6,0g, 20mmol) trong diclometan (40ml) ở -78°C trong khoảng thời gian 20 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó trong 30 phút và sau đó chuyển sang bình đáy tròn khác chứa isopropyl clorua của este L-alanin (3,35g, 20mmol) trong diclometan (100ml) ở 0°C . Mẽ triethylamin thứ hai (5,84ml, 42mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 1 giờ và sau đó dung môi được làm bay hơi. Cặn được nghiền cùng với etyl axetat (60ml) và chất rắn màu trắng được lọc bỏ. Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng nhạt ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ khoảng 1:1. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ -0,49, -0,58. Sản phẩm thu được được tinh chế bằng cách chiết, kết tinh, hoặc sắc ký, như nêu trên.

Ví dụ 10-2. Điều chế hỗn hợp chất đồng phân không đối quang isopropyl este của axit (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic và tách một chất đồng phân không đối quang isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic bằng cách phân giải động gây ra bằng cách kết tinh với nhiều lượt.



60g (284mmol) phenyl diclophosphat và 300ml diclometan khan được bổ sung vào bình đáy tròn loại ba cổ dung tích 2l có lắp thanh khuấy cơ và nhiệt kế dùng cho nhiệt độ thấp. Dung dịch này được làm lạnh đến 0°C trong khí quyển nitơ và muối clorua *iso*-propyl alanat (làm khô trong lò chân không, 47,7g, 284mmol) được bổ sung vào nhanh ở dạng rắn. Hỗn hợp này được khuấy và làm lạnh đến -55°C trong bể nước đá khô-axeton. Dung dịch chứa 60,32g trietylamin (596mmol) trong 300ml diclometan được bổ sung vào qua phễu cấp liệu bổ sung trong 70 phút. Hỗn hợp đục màu trắng được khuấy ở -55°C trong nửa giờ và sau đó nhiệt độ được nâng từ từ lên đến -5°C trong 1,5 giờ. Hỗn hợp này được làm nguội sơ bộ (nhiệt độ trong phòng) gồm pentaflorphenol (52,42g, 284mmol) và trietylamin (32,11g, 317mmol) trong 180ml diclometan được bổ sung vào hỗn hợp qua phễu cấp liệu bổ sung trong 1 giờ ở 0°C và hỗn hợp thu được được khuấy ở 0°C trong 4 giờ. Chất kết tủa màu trắng (TEA.HCl) được lọc ra và rửa bằng diclometan (3x 50ml). Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm và cặn rắn màu trắng được nghiền trong 880ml t-butyl metyl ete (TBME) ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Huyền phù màu trắng được lọc và chất rắn được rửa bằng TBME (3x 150ml). Chất rắn được phân phối vào hỗn hợp gồm etyl axetat (600ml) và nước (150ml). Lớp hữu cơ được tách và rửa bằng nước (3 x 100ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO₄ và cô để tạo ra 29,92g (66mmol) sản phẩm (chất đồng phân S_p, như được xác nhận bởi phân tích tinh thể học tia X, nêu trên) ở dạng rắn rất nhẹ màu trắng.

Dịch lọc thu được từ bước nghiền TBME nêu trên được cô trong điều kiện áp suất giảm thành cặn rắn màu trắng và cặn rắn này được nghiền trong 450ml hỗn hợp gồm etyl axetat và hexan (theo tỷ lệ thể tích 20:80) ở nhiệt độ trong phòng trong 75 phút. Chất rắn này (được gọi là chất rắn 1) được gom bằng cách lọc và rửa bằng dung dịch chứa 20% etyl axetat trong hexan (75ml, 2x 30ml). Nước cái được cô để tạo ra chất rắn màu trắng đục mà được nghiền trong dung dịch chứa 20% etyl axetat trong hexan (185ml) ở nhiệt độ trong phòng trong 17 giờ. Chất rắn màu trắng (được gọi là chất rắn 2) được gom bằng cách lọc và rửa bằng dung dịch chứa 20% etyl axetat trong hexan (2 x 10ml). Chất rắn 1 và chất rắn 2 được kết hợp và hòa tan trong 1,2l etyl axetat. Dung dịch này được rửa bằng nước (3x 150ml), nước muối (50ml) và làm khô trên MgSO₄. Dung dịch này được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 72,8g

(161mmol) sản phẩm tinh khiết. Tổng khối lượng của sản phẩm là 102,72g (226mmol, 80%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7,38-7,33 (m, 2 H), 7,27-7,24 (m, 2 H), 7,23-7,19 (m, 1 H), 5,04 (hept, 1 H), 4,18-4,09 (m, 1 H), 4,01-3,96 (m, 1 H), 1,45 (d, 3 H), 1,25 (dd, 6 H). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz) δ : -0,50.

Ví dụ 10-3: Điều chế hỗn hợp chất đồng phân không đối quang isopropyl este của axit (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic và tách một chất đồng phân không đối quang isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic bằng cách phân giải động thông qua kết tinh thành một mẻ.

Phenyl phosphorodichloridat (25g, 118,5mmol) được nạp vào bình ba cổ khô loại dung tích 1l có lắp nhiệt kế dành cho nhiệt độ thấp và thanh khuấy cơ. Diclometan khan (125ml) được bổ sung vào và dung dịch này được làm lạnh đến 0°C . Muối của alanin este (đã được sấy khô trong lò) (19,86g, 1 đương lượng) được bổ sung vào nhanh trong khí quyển N_2 trong khi được khuấy. Dung dịch này được làm lạnh đến khoảng -50°C (nhiệt độ bên trong (trong bể axeton/nước đá khô trong khí quyển N_2)). Dung dịch chứa triethylamin (25,2g, 2,1 đương lượng) trong DCM (125ml) được bổ sung nhỏ giọt vào qua phễu cấp liệu bổ sung trong 0,5 giờ ở -50°C và huyền phù đặc màu trắng thu được được khuấy ở khoảng -50°C trong 0,5 giờ. Hỗn hợp này được để ấm đến 0°C trong 1,5 giờ và tiếp đó dung dịch đã được làm nguội và trộn sơ bộ chứa pentafluorophenol (21,82g, 1 đương lượng) và TEA (13,2g, 1,1 đương lượng) (chú ý: có tỏa nhiệt trong khi trộn pentafluorophenol và TEA) trong 75ml DCM được bổ sung vào trong 0,5 giờ ở 0°C qua phễu cấp liệu bổ sung. Hỗn hợp này được khuấy ở 0°C trong 4 giờ nữa.

Hỗn hợp này được lọc qua phễu Buchner và triethylamin hydrochlorua rắn gom được rửa bằng DCM (3 x 40ml). Dịch lọc được kiểm tra theo phương pháp ^{31}P -NMR (tỷ lệ khoảng 1,14:1 thiên về chất đồng phân không đối quang S_p - pic dịch chuyển về phía trường yếu) và được chia thành hai phần có trọng lượng bằng nhau. Một phần được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn rắn màu trắng (31g) được nghiền trong hỗn hợp gồm EtOAc và hexan (150ml, tỷ lệ thể tích 20:80) ở nhiệt độ trong phòng trong 17 giờ để có thời gian cho việc phân giải động chất đồng phân kém hòa tan S_p . Huyền phù đặc màu trắng được lọc và chất rắn được rửa bằng dung dịch chứa

20% EtOAc trong hexan (2x 25ml). Chất rắn (22,58g) được kiểm tra theo phương pháp $^1\text{H-NMR}$ và $^{31}\text{P-NMR}$ và nó chứa sản phẩm ở dạng một chất đồng phân lẫn với triethylamin muối clorua. Chất rắn này được hòa tan và phân bố giữa 310ml EtOAc và 100ml nước. Sau khi tách lớp hữu cơ, lớp nước được chiết lại bằng EtOAc (50ml). Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (3x 80ml), nước muối (50ml) và làm khô trên MgSO_4 . Dung dịch này được cô trong điều kiện áp suất giảm và sau đó làm khô trong chân không cao ở nhiệt độ trong phòng đến khối lượng không đổi để tạo ra 17,36g sản phẩm ở dạng rắn màu trắng từ một nửa của hỗn hợp phản ứng. Hiệu suất là 64%. Nước cái từ bước nêu trên được cô thành cặn dính (7,89g) mà chứa các chất phản ứng với tỷ lệ 1:1,2 thành phần mong muốn/thành phần không mong muốn) theo $^{31}\text{P-NMR}$.

Ví dụ 10-4. Điều chế isopropyl este của axit (S)-2-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic

DCM (11,5l) được nạp vào bình phản ứng thủy tinh sạch và khô. Phenyldiclophosphat (2,3kg, 10,9mol) được nạp vào bình phản ứng trong khí quyển nitơ. Sau đó, dung dịch này được làm lạnh đến 0°C . Tiếp đó, L-alanin isopropyleste hydroclorua (1,83kg, 10,9mol) được bổ sung vào một lần và tiếp tục khuấy trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến nhiệt độ bên trong bằng -50°C bằng cách sử dụng bể nước đá/axeton. Hỗn hợp gồm TEA (2,1 đương lượng, 3,17l) trong DCM (11,5l) được bổ sung từ từ vào dung dịch phản ứng nêu trên trong khoảng thời gian 8 giờ để giữ nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ -40°C đến -50°C . Sau khi hoàn thành việc bổ sung, hỗn hợp phản ứng được duy trì ở cùng khoảng nhiệt độ đó trong khoảng 1 giờ. Hỗn hợp này được để ấm đến 0°C trong khoảng 4 giờ.

Đồng thời, DCM (6,9l) được nạp vào trong bình phản ứng khác, và tiếp đó pentafluorophenol (2,0kg, 10,9mol) được bổ sung vào trong khí quyển nitơ. Dung dịch này được làm lạnh đến 0°C , tiếp đó TEA (1,1 đương lượng, 1,65l) được bổ sung vào dung dịch pentafluorophenol này (tỏa nhiệt) trong khoảng thời gian khoảng 2 giờ. Về phần mình, dung dịch thu được được bổ sung từ từ vào dung dịch thứ nhất chứa phenyl diclophosphat và este của axit amin trong khi giữ nhiệt độ trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian khoảng 7 giờ. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, tiếp tục khuấy ở khoảng nhiệt độ đó trong khoảng 4 giờ. Diễn tiến của phản ứng được theo dõi theo phương pháp HPLC. Khi lượng pentafluorophenol còn lại ít hơn 5%, phản ứng được dừng

lại. Lưu ý rằng HPLC không đối xứng cho thấy hỗn hợp gồm lượng bằng nhau của các chất đồng phân không đối quang của sản phẩm vào thời điểm này.

Huyền phù phản ứng được lọc qua bộ lọc Nutsche để loại bỏ phần lớn muối clorua của triethylamin đã được tạo huyền phù. Bánh lọc muối được rửa bằng lượng dư DCM (9l) và nước rửa này được bổ sung vào dịch lọc chính. Dịch lọc này được cô trong điều kiện áp suất giảm ở 35°C để tạo ra cặn rắn. Cặn rắn được làm bay hơi cùng với hexan (4l) để làm giảm tiếp lượng DCM còn sót lại. 6l 20% MTBE/hexan được bổ sung vào chất rắn còn sót lại và huyền phù này được khuấy trong 17 giờ ở nhiệt độ môi trường và được theo dõi theo phương pháp HPLC. Độ pH của dung dịch này vẫn là kiềm do TEA còn sót lại. Trong khoảng thời gian này, thực hiện việc phân giải động, trong đó chất rắn kết tủa ra là chất đồng phân không đối quang S_p mong muốn và dịch nổi vẫn cân bằng giữa chất đồng phân đối quang S_p và chất đồng phân không đối quang R_p -4.

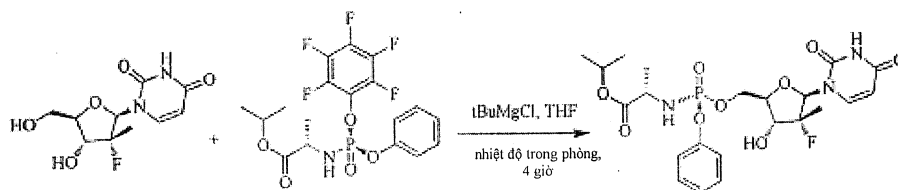
Huyền phù này được đưa qua bộ lọc Nutsche và chất rắn là sản phẩm mong muốn, vẫn còn lẫn TEA hydroclorua, được rửa bằng 5% MTBE/Hexan (1l). Chất rắn này được hòa tan trong etyl axetat (35l) và dung dịch được rửa bằng nước (3 x 35l) và nước muối (10l) và sau đó dung dịch này được làm khô trên natri sulfat rắn, lọc, cô trong điều kiện áp suất giảm, giữ nhiệt độ của bình phản ứng thấp hơn 44°C. Cặn rắn được làm bay hơi cùng với hexan (4l). Bình phản ứng được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ môi trường và 5% MTBE/hexan (5l) được bổ sung vào. Huyền phù đặc được khuấy trong 15 phút và tiếp đó chất rắn được gom bằng cách lọc. Chất rắn gom được rửa bằng hexan (2,5l) và làm khô trong chân không cao ở nhiệt độ môi trường đến khối lượng không đổi để tạo ra thành phẩm (chất đồng phân không đối quang S_p) ở dạng rắn màu trắng, 2,6kg (53%); tinh khiết 99,5% theo phương pháp HPLC, 0,4% lượng còn lại là chất đồng phân không đối quang R_p .

Ví dụ 10-5. Điều chế (S)-isopropyl 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)-phosphorylamino)propanoat.

Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (12,4ml, 21mmol, 2,1 đương lượng)) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-3-methyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion (có

công thức 3, 2,6g, 10mmol) trong THF khan (50ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 15 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (2-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (4,08g, 10mmol) thô triệt quang trong THF (15ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 10 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 72 giờ. TLC đồng điểm với sản phẩm thực cho thấy khoảng từ 40% đến 50% sản phẩm mong muốn đã được tạo ra so với nucleosit ban đầu.

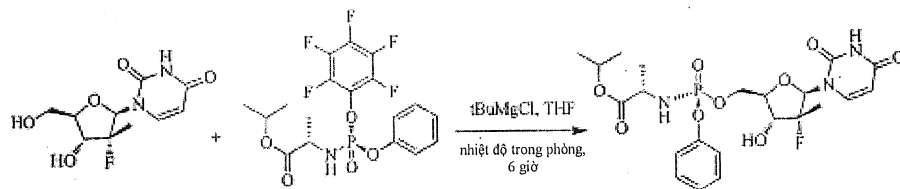
Ví dụ 10-6. Điều chế (S)-isopropyl 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)-phosphorylamino)propanoat (S_P-4) bằng cách sử dụng isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic và tinh chế chỉ bằng cách kết tinh.



Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M trong THF (47,5ml, 80,77mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa hợp chất có công thức 3 (10g, 38,46mmol, được làm khô trong chân không ở 50°C trong 20 giờ) trong THF khan (165ml) trong khoảng thời gian 20 phút trong khi giữ bình phản ứng này trong bể nước lạnh (5°C) trong khí quyển nitơ. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, bể lạnh này được loại bỏ và huyền phù màu trắng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng (20°C) trong 30 phút. Tiếp theo, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxyphosphorylamino] propionic (20,9g, 46,11mmol) trong THF khan (165ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trong khoảng thời gian 30 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng (20°C) trong 3,5 giờ. Tiếp tục khuấy trong 1,5 giờ nữa, trong giai đoạn đó TLC cho thấy mức độ chuyển hóa >95% và không có khác biệt đáng kể nào về mật độ tạp chất 3',5'-phosphoramidat so với 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng dung dịch nước NH₄Cl bão hòa (10ml) và tiếp theo dung môi được làm bay hơi ở 25°C. Cặn được phân bố giữa ethyl axetat (400ml) và hỗn hợp amoni clorua bão hòa (60ml)/nước (20ml). Lớp hữu cơ được tách, rửa bằng amoni clorua bão hòa (80ml) và nước (3 x 60ml). Cho đến thời

điểm này, lớp nước được giữ riêng rẽ. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri cacbonat 5% (3 x 50ml) và nước (2 x 60ml). Lớp nước thứ nhất được chiết bằng etyl axetat bổ sung (100ml), rửa bằng nước (2 x 20ml) và tiếp theo lớp nước thu được từ các nước rửa bằng natri cacbonat cũng được chiết bằng chính chiết xuất etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước (2 x 20ml) và kết hợp với mẻ chính. Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô để tạo ra chất rắn dạng bột (19,32g). Cặn này được hòa tan trong 60ml diclometan (chất rắn màu trắng được làm kết tủa ra và bánh lọc được tạo ra trong khoảng năm phút) và sau đó được bổ sung vào 25ml IPE. Huyền phù này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng hỗn hợp gồm IPE/diclometan lạnh (0°C) theo tỷ lệ 1:1 (20ml) và làm khô để tạo ra 11,77g (hiệu suất 58%) sản phẩm ở dạng rắn màu trắng vô định hình. Chất rắn nêu trên được hòa tan lại trong diclometan (350ml), lọc và làm bay hơi trong khí quyển (nhiệt độ bề 45°C) đến thể tích ~120ml. Dung dịch này được để yên ở nhiệt độ trong phòng (21°C) trong 20 giờ. Chất rắn tinh thể màu trắng (diclometan solvat) được gom bằng cách lọc, rửa bằng lạnh (0°C) diclometan (10ml) và làm khô trong chân không cao trong 4 giờ ở nhiệt độ môi trường để tạo ra sản phẩm không được solvat hóa tinh khiết (10,62g, hiệu suất 52%) ở dạng tinh thể hình kim màu trắng. Độ tinh khiết theo phân tích HPLC là 99,8%. Các đặc tính phổ phù hợp với các trị số được thông báo trong bản mô tả này.

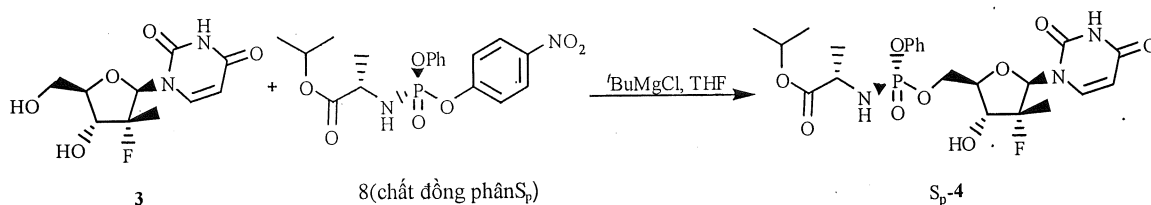
Ví dụ 10-7. Điều chế (S)-isopropyl 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-metyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)-phosphorylamino)propanoat (có công thức Sp-4) bằng cách sử dụng isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic, các điều kiện phản ứng được cải biến và xử lý và tinh chế chỉ bằng cách kết tinh.



Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M trong THF (23,7ml, 40,35mmol) được bổ sung vào huyền phù được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-metyltetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion (có công thức 3, 5,0g, 19,1mmol, được làm khô trong chân không ở 50°C trong 20 giờ) trong THF

khan (75ml) bằng cách sử dụng phễu cấp liệu bổ sung trong khoảng thời gian 30 phút ở -5°C . Huyền phù màu trắng được khuấy ở nhiệt độ này trong 30 phút và tiếp theo làm ấm đến nhiệt độ môi trường (20°C) mà được khuấy ở nhiệt độ đó trong 30 phút nữa. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội đến 5°C và sau đó được bổ sung vào dung dịch chứa isopropyl este của axit (*S*)-2-[(5)-(2,3,4,5,6-pentafluorophenoxy)-phenoxyphosphorylamino] propionic (10,45g, 23,06mmol) trong THF (50ml) trong khoảng thời gian 30 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở 5°C trong 18 giờ, được làm lạnh đến -5°C và sau đó làm được tới bằng dung dịch HCl 2N (25ml). Toluene (100ml) được bổ sung vào hỗn hợp này và làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Sau 20 phút, các lớp được tách. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch HCl 1N (2 x 10ml), nước (10ml), dung dịch nước Na_2CO_3 5% (4 x 10ml), nước (2 x 10ml) và nước muối (10ml). Tất cả các lớp nước được chiết lại bằng toluene (20ml), rửa bằng dung dịch nước Na_2CO_3 5% (2 x 5ml), nước (10ml) và nước muối (5ml). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, lọc và làm bay hơi đến thể tích khoảng 20ml. Diclometan (20ml) được bổ sung vào dung dịch này và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Chất rắn được lọc, rửa bằng hỗn hợp MTBE/DCM theo tỷ lệ 1:1 (2 x 10ml) và làm khô trong chân không cao để tạo ra chất rắn màu trắng (7,7g). Phân tích chất rắn này theo phương pháp HPLC vào thời điểm đó cho thấy 98,21% hợp chất có công thức S_p-4 , 0,18% hợp chất có công thức 3 chưa phản ứng và 0,67% tạp chất 3',5'-bis-phosphoramidat. Chất rắn có công thức S_p-4 này được hòa tan lại trong diclometan (77ml, được đun nóng trong bình chịu áp ở 55°C) và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ. Chất rắn ở dạng tinh thể được lọc, rửa bằng diclometan lạnh (5ml, 0°C) và làm khô trong chân không cao để tạo ra sản phẩm tinh khiết ở dạng rắn màu trắng (6,9g, hiệu suất 68%, tinh khiết 99,79% theo phương pháp HPLC).

Việc điều chế và tinh chế C hoặc C' cho phép tiếp xúc trực tiếp với hợp chất có công thức S_p-4 hoặc R_p-4 , như được minh họa trong các ví dụ sau:



Ví dụ 11. Điều chế hợp chất có công thức S_p -4 (quy mô 32mg): Dung dịch 1M chứa tButylmagie clorua (0,26ml, 0,26mmol, 2,1 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion có công thức 3 (32mg, 0,12mmol) trong THF khan (1ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 3 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (có công thức 8, chất đồng phân S_p) trong THF (0,5ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 3 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 42 giờ và sau đó làm nguội bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (10ml). Hỗn hợp này được phân bố giữa etyl axetat và nước. Chiết xuất hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô. Cặn được sắc ký bằng cách sử dụng gradien 0% - 4% metanol/diclometan để tạo ra hợp chất có công thức S_p -4 ở dạng bột rắn (29mg, hiệu suất 44,5%). Dữ liệu 1H và ^{31}P NMR phù hợp với dữ liệu được bộc lộ trong bản mô tả này.

Ví dụ 12. Điều chế hợp chất có công thức S_p -4 (quy mô 2,6g, không sắc ký): Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (12,4ml, 21mmol, 2,1 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion (2,6g, 10mmol) trong THF khan (50ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 15 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (có công thức 8, chất đồng phân S_p , 4,08g, 10mmol) trong THF (15ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 10 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 60 giờ và sau đó làm nguội bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (20ml). Hỗn hợp này được phân bố giữa etyl axetat (150ml) và lần lượt trong dung dịch nước Na_2CO_3 10% (3 x 20ml) và nước (20ml). Chiết xuất hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra cặn màu vàng nhạt (3,8g). Cặn này được hòa tan trong diclometan (7,6ml) và tiếp theo được khuấy trong 20 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Chất rắn màu trắng được lọc, rửa bằng IPE/diclometan theo tỷ lệ 1:1 (5ml) và làm khô trong chân không để tạo ra sản phẩm tinh khiết ở dạng rắn màu trắng (1,85g, hiệu suất 35%).

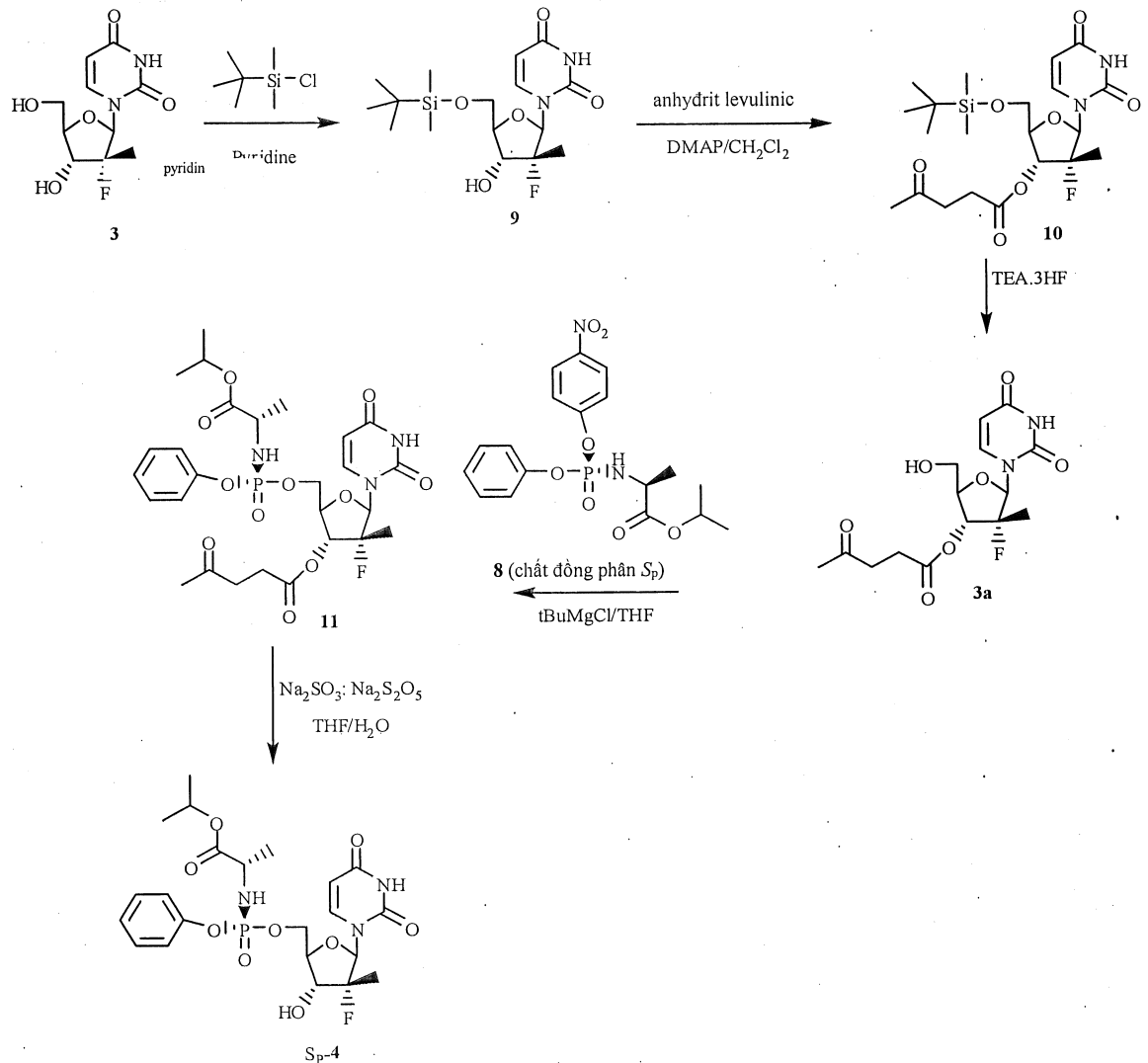
Ví dụ 13. Điều chế hợp chất có công thức S_p-4 bằng cách sử dụng NaHMDS: Dung dịch natri bis(trimetylsilyl)amit (NaHMDS) trong THF 2,0M (270 μ l, 0,54mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion (71mg, 0,27mmol) trong THF khan (2,0ml) ở -78°C trong khoảng thời gian 2 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-Nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino]-propionic (có công thức 8, chất đồng phân S_p , 111mg, 0,27mmol) trong THF (1ml) được bổ sung vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ này trong 2 giờ và tiếp theo được nâng nhiệt độ lên đến -20°C và được khuấy ở nhiệt độ đó trong 20 giờ nữa. TLC cho thấy ~30% nguyên liệu ban đầu nucleosit chưa phản ứng. Do đó, thêm 0,5 đương lượng chất phản ứng (55mg, 0,14mmol) trong THF (0,5ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này và khuấy trong 6 giờ nữa. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và tiếp theo được phân bố giữa etyl axetat và nước. Chiết xuất hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô để tạo ra cặn màu nâu nhạt. Phân tích sản phẩm thô theo phương pháp sắc ký cột bằng cách sử dụng gradien 0% - 5% metanol/diclometan tạo ra hợp chất có công thức S_p-4 (22mg, hiệu suất 15%), 3'-phosphoramidat (có công thức 5, chất đồng phân S_p , 11,5mg, hiệu suất 16%) và bis phosphoramidat (có công thức 6, S_p , chất đồng phân S_p , 12,6mg).

Ví dụ 14. Điều chế hợp chất có công thức R_p-4 (quy mô 260mg): Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (1,23ml, 2,1mmol, 2,1 đương lượng)) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flo-4-hydroxy-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1H-pyrimidin-2,4-dion (260mg, 1mmol) trong THF khan (6ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 5 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(R)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (có công thức 8, chất đồng phân R_p) trong THF (3ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 3 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 96 giờ và sau đó làm nguội bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (10ml). Hỗn hợp này được phân bố giữa etyl axetat (50ml) và nước (2 x 20ml). Chiết xuất hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra cặn màu vàng nhạt (490mg). Cặn này được sắc ký bằng cách sử dụng gradien

0% - 5% metanol/diclometan để tạo ra sản phẩm ở dạng rắn màu trắng (160mg, hiệu suất 30%).

Có thể điều chế hợp chất có công thức S_p-4 hoặc R_p-4 bằng cách cho hợp chất có công thức 3 được bảo vệ ở vị trí 3' phản ứng với chất phản ứng thích hợp C hoặc C' hoặc hỗn hợp chứa hợp chất có công thức C và C', như được minh họa trong các ví dụ sau.

Ví dụ 15. Điều chế hợp chất có công thức S_p-4 với chất trung gian tổng hợp là hợp chất có công thức 3a



Ví dụ 15-1. Tổng hợp 5'-O-tert-Butyldimetylsilyl-2'-deoxy-2'-flo-2'-C-metyluridin (có công thức 9)

Dung dịch chứa TBDMSCl (103,19g, 685,6mmol) trong pyridin khan (500ml) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch được khuấy chứa 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-methyluridin (có công thức 3, 81,1g, 312mmol) trong pyridin khan (750ml) trong khoảng thời gian 45 phút ở nhiệt độ môi trường. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 24 giờ. Metanol (85ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và nó được khuấy trong 10 phút và tiếp theo các dung môi được cất ra khỏi trong điều kiện áp suất giảm. Nước nóng (45°C) (1l) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này và hỗn hợp này được chiết bằng etyl axetat (2 x 500ml), rửa bằng nước (1 x 500ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan. Etyl axetat được cất ra khỏi và cặn thu được được làm bay hơi cùng với toluen (2 x 500ml) để tạo ra hợp chất có công thức 9 thô ở dạng bột màu trắng. Hiệu suất = 116,9g (định lượng). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0,1 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 1,22 (d, 3H, J = 21 Hz), 2,50 (s, 2H), 3,75-4,05 (m, 4H), 5,54 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,73 (s, 1H), 6,0 (d, 1H, J = 18 Hz), 7,81 (d, 1H, J = 9 Hz), 8,57 (br, s, 1H), 11,1 (s, 1H).

Ví dụ 15-2. Tổng hợp 5'-O-(tert-butylidimetylsilyl)-3'-levulinyl-2'-deoxy-2'-flo 2'-C-methyl-uridin (có công thức 10)

DMAP (30,5g, 249,7mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa nucleosit có công thức 9 (116,9g, 312,1mmol) trong DCM (1l) và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Dung dịch chứa anhydrit levulinic (133,6g, 642,3mmol) trong DCM (200ml) được bổ sung vào hỗn hợp này và khuấy trong 24 giờ. Phân tích hỗn hợp theo phương pháp TLC cho thấy phản ứng đã hoàn thành. Nước lạnh (500ml) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 20 phút. Các lớp được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa (2 x 250ml), làm khô trên natri sulfat khan và tiếp theo dung môi được chưng cất trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu màu vàng. Hiệu suất thô: 197,6g (135%). Chất này được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 0,11 (s, 6H), 0,94 (s, 9H), 1,34 (d, 3H, J = 21 Hz), 2,22 (s, 3H), 2,6-2,89 (m, 4H), 3,72 (m, 1H), 4,01 (d, 1H, J = 12 Hz), 4,23 (d, 1H, J = 9 Hz), 5,33 (dd, 1H, J = 15 Hz), 5,73 (d, 1H, J = 6 Hz), 6,26 (d, 1H, J = 15 Hz), 8,12 (d, 1H, J = 12 Hz), 8,72 (br, s, 1H).

Ví dụ 15-3. Tổng hợp 3'-O-levulinyl-2'-deoxy-2'-flo 2'-C-methyl-uridin (có công thức 3a)

Hợp chất có công thức 10 thô (197,6g, ~312,1mmol) được hòa tan trong DCM (11), TEA.3HF (50,3g, 312,1mmol) được bổ sung vào và khuấy qua đêm ở nhiệt độ môi trường. Phân tích hỗn hợp theo phương pháp TLC cho thấy phản ứng đã hoàn thành khoảng 50%. Một đương lượng nữa TEA.3HF (50,3g, 312,1mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được phép khuấy trong 6 giờ. Phân tích TLC vào thời điểm này cho thấy khoảng 10% nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng. 0,25 đương lượng TEA.3HF nữa (12,5g, 78,0mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được phép khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được cô đến khô để tạo ra dầu màu vàng. Hợp chất thô từ tất cả các mẻ được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (0% đến 2% MeOH trong DCM) để tạo ra 124,1g 3'-levulinat ở dạng rắn bột màu trắng (hiệu suất tinh chế 90% sau ba bước từ 2'-deoxy-2'-flo-2'-C-methyluridin). ¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ 1,55 (d, 3H, CH₃, J = 20 Hz), 2,36 (s, 3H, CH₃), 2,8-3,03 (m, 5H, CH₂CH₃), 3,91-3,96 (dd, 1H, CH"), 4,2-4,25 (m, 1H, CH'), 4,34 (dd, 1H, CH, J = 8 Hz), 5,25 (dd, 1H, J = 16 Hz), 5,93 (d, 1H, J = 8 Hz), 8,20 (d, 1H, J = 8 Hz), 9,18 (s, 1H).

Ví dụ 15-4. Tổng hợp theo cách chọn lọc đồng phân không đối quang (S)-isopropyl este của axit (S)-2-{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-4-(R)-flo-3-(4-oxopentanoyl)-4-methyl-tetrahydro-furan-2-ylmetoxy]-phenoxy-phosphorylamino}-propionic (có công thức 11)

tBuMgCl (1,7M trong THF, 2 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch chứa nucleosit (có công thức 3a, 1,00mmol, 358mg) trong 5ml THF khan mà được làm lạnh đến 0°C và để ấm đến nhiệt độ môi trường và khuấy trong nửa giờ. Chất phản ứng (độ tinh khiết không đối xứng khoảng 97%) isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxy-phosphorylamino] propionic (có công thức 8, chất đồng phân S_p) (408mg, 1,00mmol, 1,00 đương lượng) được bổ sung vào một mẻ hỗn hợp này, rồi được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 16 giờ, chỉ còn lại khoảng ~30% nguyên liệu ban đầu. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng 10ml dung dịch NH₄Cl bão hòa, và pha nước được chiết bằng etyl axetat (3 x 25ml). Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối và làm khô trên natri sulfat khan và làm bay hơi đến khô để tạo ra bột màu vàng nhạt (500mg). Bột này được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel bằng cách sử dụng 2% đến 5% metanol trong metylen clorua để tạo ra sản phẩm ở dạng bột

màu trắng (275mg) độ tinh khiết không đối xứng P khoảng 97% và nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng (162mg). Theo lượng nguyên liệu ban đầu đã được tiêu thụ, hiệu suất tính được là 76%. ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): 3,7 ppm; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,22 (dd, 6H, $J = 6,4$ Hz), 1,37 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,63-2,9 (m, 4H), 4,0 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H, $J = 9$ Hz), 5,42 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,19 (d, 1H, $J = 18$ Hz), 7,15-7,35 (m, 5 H), 7,5 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz), 8,2 (br, s, 1H).

Ví dụ 15-5. Tổng hợp (S)-isopropyl este của axit (S)-2- $\{[(1R,4R,5R)-5-(2,4\text{-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-4-(R)-flo-3-hydroxy-4-metyl-tetrahydro-furan-2-ylmetoxy]-phenoxy-phosphorylamino\}$ -propionic (có công thức S_p-4)

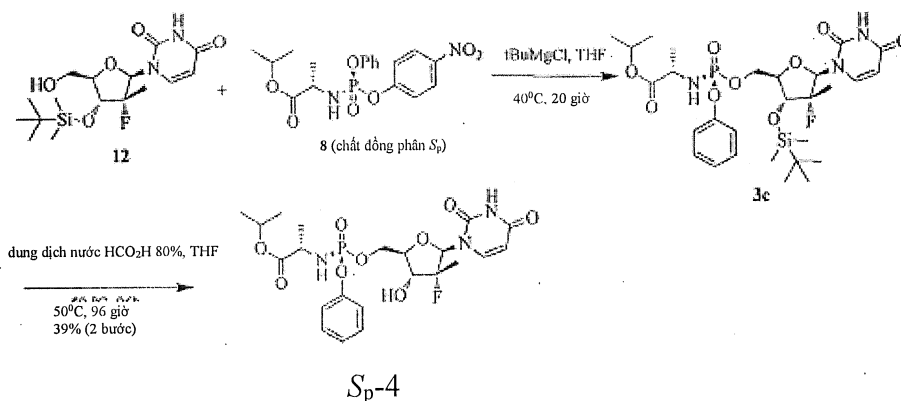
Dung dịch chứa natri sulfit được điều chế bằng cách bổ sung $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1,51g) và $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,57g) trong nước (25ml) vào. 1,0ml dung dịch natri sulfit được bổ sung vào dung dịch chứa levulinat (có công thức 11, 250mg, 0,40mmol) trong THF khan (2,5ml). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào nước (15ml) và chiết bằng etyl axetat (3x25ml), làm khô và làm bay hơi để tạo ra theo cách định lượng chất rắn màu trắng sản phẩm với độ tinh khiết không đối xứng P khoảng 97%, phù hợp với các tính chất vật lý và các đặc tính phổ của hợp chất có công thức S_p-4 thu được một cách trực tiếp từ nucleosit không được bảo vệ.

Ví dụ 16. Quy trình khác để điều chế hợp chất có công thức S_p-4 từ hợp chất có công thức 3a

Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (1,07ml, 1,82mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydro-2H-pyrimidin-1-yl)-4-flo-2-hydroxymetyl-4-metyl-tetrahydro-furan-3-yl este của axit 4-oxopentanoic (có công thức 3a, 210mg, 0,59 mmol) trong THF khan (1,5ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 2 phút. Ban đầu, quan sát thấy có chất kết tủa màu trắng và sau 10 phút hỗn hợp phản ứng này chuyển thành dung dịch màu vàng đậm. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2- $[(S)-(4\text{-nitrophenoxy})\text{-phenoxy-phosphorylamino}]$ -propionic (có công thức 8 (chất đồng phân S_p), 382mg, 0,94mmol) trong THF (1,5ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 3 phút. Hỗn hợp này được đun nóng ở 40°C trong 5 giờ, trong thời gian đó phân tích

TLC và ^1H NMR cho thấy lượng nguyên liệu ban đầu còn lại chưa phản ứng ít hơn 2%. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và tiếp theo phân bố giữa etyl axetat và nước. Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước Na_2CO_3 10% (3 x 10ml), tiếp theo bằng nước. Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan và cô để tạo ra cặn màu nâu (410mg). Sản phẩm thô được hòa tan trong tetrahydrofuran (1,0ml) và sau đó được bổ sung vào dung dịch nước chứa hỗn hợp gồm natri sulfit (37mg, 0,295mmol) và natri metabisulfite (224mg, 1,18mmol) trong 1ml nước. Hỗn hợp này được đun nóng ở 45°C trong 20 giờ, trong giai đoạn đó quan sát được mức độ chuyển hóa chỉ khoảng 10% theo phương pháp TLC, do đó thêm natri sulfit (74mg) và natri metabisulfite (448mg) được bổ sung vào và tiếp tục đun nóng trong 52 giờ nữa. Vào thời điểm này, quan sát được mức độ chuyển hóa khoảng 40% theo phương pháp TLC. Hỗn hợp phản ứng này được phân bố giữa nước và etyl axetat. Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô để tạo ra cặn màu nâu (210mg). Phân tích cặn theo phương pháp sắc ký cột bằng cách sử dụng gradien 0% - 5% MeOH/DCM để thu hồi nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng (89mg) và hợp chất có công thức S_p-4 (57mg, hiệu suất 18%, 24% tính theo nguyên liệu ban đầu thu hồi được).

Ví dụ 17. Điều chế hợp chất có công thức S_p-4 với chất trung gian tổng hợp là hợp chất có công thức 3c



Ví dụ 17-1. Điều chế 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-3-fluoro-5-hydroxymethyl-3-methyl-tetrahydro-furan-2-yl]-1H-pyrimidin-2,4-dion, có công thức 12

Diethylmetan (50ml) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 3 (10,0g, 38,43mmol) trong pyridin (50ml). Dung dịch này được làm lạnh đến 0°C . 4,4'-dimethoxytrityl clorua (14,32g, 42,27mmol) được bổ sung vào dung dịch này và dung

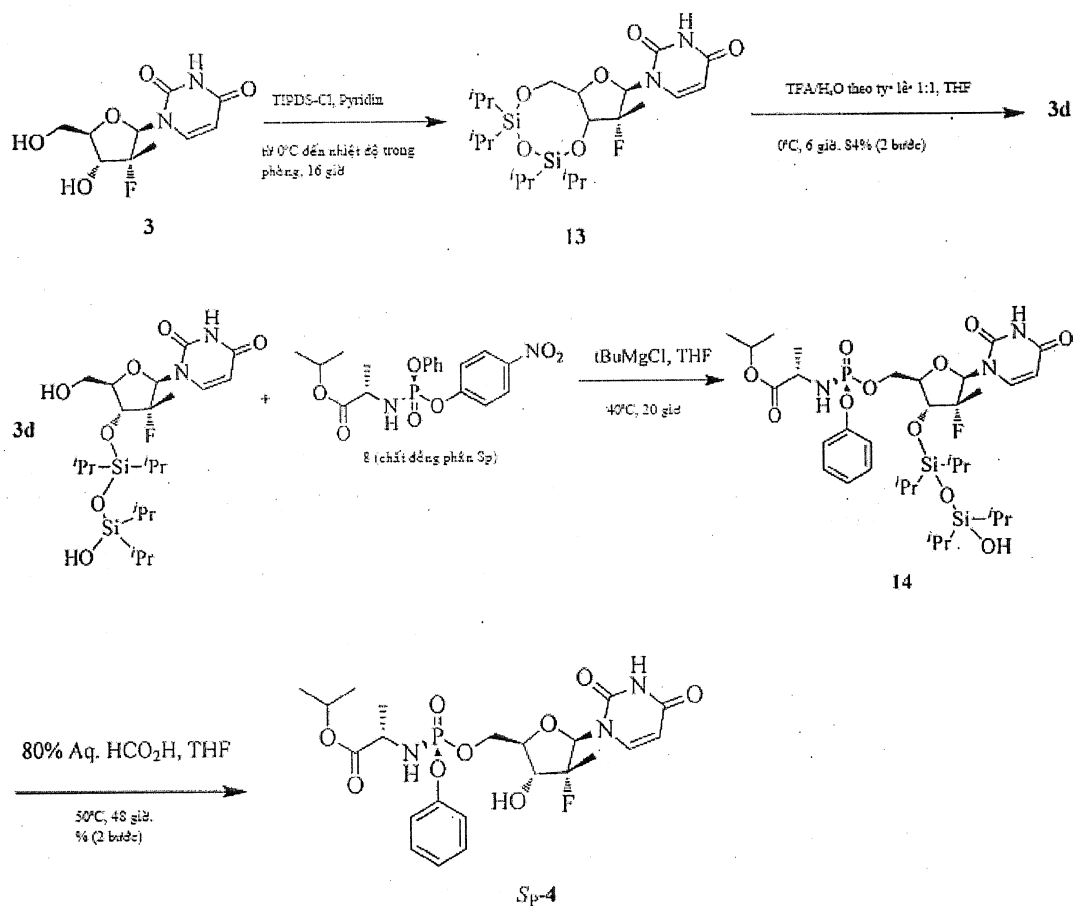
dịch thu được được khuấy ở 0°C trong 5 giờ. Metanol (5ml) được bổ sung vào để làm nguội hỗn hợp phản ứng này. Dung dịch này được cô đến khô trong điều kiện áp suất giảm và cặn được phân bố giữa etyl axetat (500ml) và nước (50ml). Dung dịch hữu cơ được rửa bằng nước muối (50ml) và làm khô (natri sulfat, 4g). Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và cặn được hòa tan trong diclometan (100ml). Imidazol (7,83g, 115mmol) và t-butyldimetylsilyl clorua (8,68g, 57,6mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 16 giờ. Metanol được bổ sung vào để làm nguội hỗn hợp phản ứng (5ml) và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và cặn được phân bố giữa etyl axetat (500ml) và nước (50ml). Dung dịch hữu cơ được làm khô (natri sulfat, 4g) và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột (10% - 40% EtOAc trong hexan) để tạo ra sản phẩm trung gian 5'-O-DMT-3'-O-tBDMS. Hợp chất này được xử lý bằng dung dịch chứa 1% axit trifloaxetic trong diclometan (200ml). Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 1 giờ. Nước (20ml) được bổ sung vào và dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 1 giờ nữa. Metanol (5ml) được bổ sung từ từ vào và dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 1 giờ nữa. Amoni hydroxit được bổ sung vào để điều chỉnh độ pH của dung dịch này đến 7. Dung dịch hữu cơ được tách, làm khô (natri sulfat, 4g) và làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột trên silicagel (dung dịch chứa 1% đến 5% metanol trong diclometan) để tạo ra hợp chất có công thức 12 ở dạng rắn màu trắng 7,5g với hiệu suất 50% sau ba bước. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm) 11,48 (br s, 1H, NH), 7,94 (d, 1H, H-6), 6,00 (d, 1H, H-1'), 5,69 (d, 1H, H-5), 4,06 (dd, 1H, 3'-H), 3,85 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3,58 (br d, 1H, H-5'b), 1,27 (d, 3 H, 2-CH₃), 0,89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0,12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

Ví dụ 17-2. Điều chế hợp chất có công thức Sp-4 bằng cách sử dụng 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butyldimetylsilyloxy)-3-flo-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl]-1H-pyrimidin-2,4-dion (có công thức 3c)

Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (1,8ml, 3,1mmol) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(tert-butyldimetylsilyloxy)-3-flo-5-hydroxymetyl-3-metyl-tetrahydro-furan-2-yl]-1H-pyrimidin-2,4-dion (có công thức 12, 374 mg, 1mmol) trong THF khan (3ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng

thời gian 2 phút. Ban đầu, quan sát thấy có chất kết tủa màu trắng và sau 10 phút hỗn hợp phản ứng này chuyển thành dung dịch trong màu vàng đậm. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitrophenoxy)-phenoxy-phosphorylamino]-propionic (có công thức 8, chất đồng phân S_p , 653mg, 1,6mmol) trong THF (2,5ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 3 phút. Hỗn hợp này được đun nóng ở 40°C trong 20 giờ, trong khoảng thời gian đó TLC và $^1\text{H NMR}$ cho thấy lượng nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng ít hơn 5%. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng dung dịch nước amoni clorua bão hòa và tiếp theo được phân bố giữa etyl axetat và nước. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước Na_2CO_3 10% (3 x 10ml), tiếp theo bằng nước (20ml). Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat khan và cô để tạo ra cặn màu nâu chứa hợp chất có công thức 3c (850mg). Sản phẩm thô được hòa tan trong tetrahydrofuran (2ml) và bổ sung vào 0,8ml dung dịch nước axit formic 80% ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng này được đun nóng ở 50°C trong 96 giờ. Quan sát được mức độ chuyển hóa 70% theo phương pháp TLC. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa lạnh và tiếp theo được phân bố giữa etyl axetat và nước. Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô để tạo ra cặn màu nâu (220mg). Phân tích cặn theo phương pháp sắc ký cột bằng cách sử dụng gradien 0% - 5% MeOH/DCM để thu hồi nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng (21 mg) và hợp chất có công thức S_p -4 (77mg, hiệu suất 35%, hiệu suất 39% tính theo nguyên liệu ban đầu thu hồi được).

Ví dụ 18. Điều chế hợp chất có công thức S_p -4 với chất trung gian tổng hợp là hợp chất có công thức 3d



Ví dụ 18-1. Điều chế hợp chất có công thức 3d

TIPDS-Cl được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch được khuấy chứa hợp chất có công thức 3 trong pyridin (20ml) ở 0°C trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp này được nâng nhiệt độ từ từ đến nhiệt độ trong phòng mà được khuấy ở nhiệt độ đó trong 16 giờ. Pyridin được làm bay hơi và cặn được làm bay hơi cùng với toluen (50ml). Tiếp theo, cặn được nghiền với hexan và chất kết tủa màu trắng được lọc bỏ bằng cách sử dụng đệm Celite. Dịch lọc được cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra chất rắn dạng bột (12,97g). Sản phẩm thô (có công thức 13) được hòa tan lại trong tetrahydrofuran (75ml) và bổ sung vào dung dịch nước chứa TFA (75ml, TFA/nước theo tỷ lệ 1:1) ở 0°C trong khoảng thời gian 20 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ đó trong 6 giờ. TLC cho thấy ~5% nguyên liệu ban đầu. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa đến độ pH=8 và tiếp theo được chiết bằng etyl axetat. Chiết xuất hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước, làm khô và cô để tạo ra chất rắn tinh thể màu trắng. Nghiền tiếp chất rắn này với hexan (30ml) để tạo

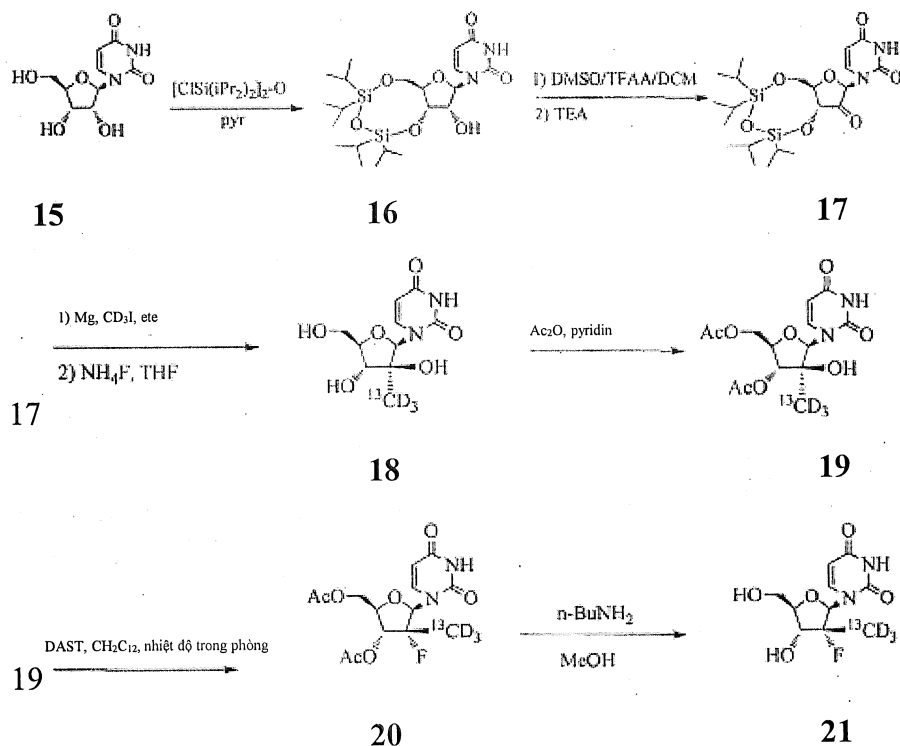
ra chất rắn màu trắng mà được lọc và làm khô trong chân không cao để tạo ra hợp chất có công thức 3d (10,1g, hiệu suất 84% sau 2 bước). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,83 (bs, 1H), 7,94 (bd, $J=6,0\text{Hz}$, 1H), 6,10 (bd, $J=18,4\text{Hz}$, 1H), 5,71 (d, $J=8,2\text{Hz}$, 1H), 4,43 (bs, 1H), 4,36 (dd, $J=22,6, 9,0\text{Hz}$, 1H), 4,27 (bs, 1H), 4,10 (d, $J=13,2\text{Hz}$, 1H), 4,03 (d, $J=9,2\text{Hz}$, 1H), 3,92 (d, $J=13,2\text{Hz}$, 1H), 1,39 (d, $J=22,0\text{Hz}$, 3H), 1,11-0,92 (m, 28H).

Ví dụ 18-2. Điều chế hợp chất có công thức S_p-4

Dung dịch chứa tert-butylmagie clorua 1,7M (1,8ml, 3,1mmol, 3,1 đương lượng)) được bổ sung vào dung dịch được khuấy chứa hợp chất có công thức 3d (520mg, 1mmol) trong THF khan (5ml) ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 15 phút. Sau 30 phút, dung dịch chứa isopropyl este của axit (S)-2-[(S)-(4-nitro-phenoxy)-phenoxyphosphorylamino] propionic (có công thức 8, chất đồng phân S_p , 653mg, 1,6mmol) trong THF (1ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong khoảng thời gian 3 phút. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 60 giờ. Phân tích mẫu thô theo phương pháp ^1H và ^{31}P NMR cho thấy hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang theo tỷ lệ 1:0,76. Hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng dung dịch nước NH_4Cl bão hòa (20ml). Hỗn hợp này được phân bố giữa etyl axetat (150ml) và lần lượt trong dung dịch nước Na_2CO_3 10% (3 x 20ml) và nước (20ml). Chiết xuất hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra cặn màu vàng nhạt (có công thức 14, 878mg).

Hợp chất nêu trên, có công thức 14, được hòa tan lại trong tetrahydrofuran (3ml) và sau đó được bổ sung vào dung dịch nước axit formic 80%. Hỗn hợp này được đun nóng ở 55°C trong 20 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến 0°C , và tiếp đó được tôi bằng dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (độ pH=7,0). Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được phân bố giữa etyl axetat và nước. Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên natri sulfat và cô để tạo ra 560mg cặn. Cặn này được phân tích theo phương pháp sắc ký bằng cách sử dụng gradien 0% - 5% metanol/diclometan để thu hồi nguyên liệu ban đầu chưa phản ứng (hợp chất có công thức 14, 242mg) và hợp chất có công thức S_p-4 (80mg, hiệu suất 15%) ở dạng rắn màu trắng.

Ví dụ 19. Điều chế hợp chất có công thức S_p-4 được đánh dấu bằng đồng vị



Ví dụ 19-1. Điều chế 1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-hydroxy-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisiloxin-8-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion, có công thức 16

Uridin (có công thức 15, 100,0g, 409,5mmol) được cùng làm bay hơi đến khô với pyridin khan (600ml) và được tạo huyền phù lại trong pyridin khan (700ml). 1,3-diclo-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan (135,7g, 482,5mmol) được bổ sung vào huyền phù mịn được khuấy này trong 60 phút ở nhiệt độ môi trường. Sau khi khuấy huyền phù mịn này trong 17 giờ ở nhiệt độ môi trường, hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng cách bổ sung metanol (20ml) vào và tiếp theo cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được phân bố giữa etyl axetat (1,5l) và nước (2l). Lớp hữu cơ được rửa tiếp bằng dung dịch axit clohydric 5% (2 x 1l), nước muối (500ml), làm khô trên natri sulfat rắn (50g), lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm thành sản phẩm thô, khoảng 250g. Cặn được lọc cột bằng cách sử dụng silicagel (1,75kg) và gradient 20% - 65% etyl axetat trong hexan. Các phân đoạn sản phẩm tinh khiết theo phân tích TLC đồng nhất (R_f 0,55 trong hexan-etyl axetat theo tỷ lệ 1:1) được kết hợp và cô trong điều kiện áp suất giảm và làm khô ($40^\circ C$, 0,2mmHg (26,6644Pa), 24 giờ) để tạo ra 145,5g (76%) hợp chất có công thức 16 ở dạng rắn bột màu trắng. Phân đoạn bổ sung (35g) hợp chất có công thức hơi lẫn tạp chất cũng được gom. 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ (ppm) 11,35 (s,

1H, NH), 7,66 (d, 1H, J= 7,6 Hz, H-6), 5,57 (d, 1H, J= 4,8 Hz, 2'-OH), 5,50-5,49 (m, 2H, 1'-H và H-5), 4,14-4,18 (m, 3H, 2', 3', 4'-H), 3,97-3,87 (m, 2H, 5'-Ha và Hb), 1,02-0,95 (m, 28H, CH(CH₃)₂).

Ví dụ 19-2. Điều chế 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-tetraisopropyl-9-oxotetrahydro-6H-furo[3,2-f][1,3,5,2,4]trioxadisiloxin-8-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion, có công thức 17

DCM khan (600ml) và DMSO (30,82g, 394,5mmol) được bổ sung vào bình tròn ba cổ khô. Dung dịch này được làm lạnh đến -78°C trong bể nước đá/axeton trong khí quyển nitơ. Anhydrit trifloaxetic (nguyên chất, 77,7g, 369,8mmol) được bổ sung vào qua xi lanh trong 40 phút và tạo ra hỗn hợp đục. Dung dịch chứa chất dẫn xuất uridin có công thức 16 trong DCM (600ml) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp này trong 75 phút ở -78°C qua phễu cấp liệu bổ sung. Hỗn hợp không đồng nhất được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -78°C đến -65°C và tiếp theo triethylamin khan (92ml) được bổ sung nhanh vào qua xi lanh để tạo ra dung dịch trong màu vàng nhạt. Sau 1 giờ ở nhiệt độ thấp, phản ứng hoàn thành như được thể hiện theo phương pháp TLC (30% EtOAc trong hexan). Bể làm nguội được loại bỏ và hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ từ từ lên đến nhiệt độ môi trường trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội bằng cách bổ sung dung dịch NH₄Cl bão hòa (180ml) vào. Nước (200ml) được bổ sung vào và lớp hữu cơ được tách. Lớp nước được chiết lại bằng DCM (300ml). Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (3x 400ml), nước muối (150ml), và làm khô trên Na₂SO₄. Việc loại bỏ dung môi tạo ra cặn dính màu nâu.

Cặn dầu thô (chứa vết DCM) được bảo quản qua đêm trong tủ đông lạnh. Sau khi qua đêm, chất rắn tinh thể được quan sát thấy trong dầu. Dầu này được hòa tan trong 500ml hexan ở nhiệt độ môi trường. Dung dịch này được bảo quản trong tủ đông lạnh trong 24 giờ và chất rắn được tạo ra thêm. Chất rắn này được gom bằng cách lọc và rửa bằng dung dịch lạnh chứa 10% DCM trong hexan (1l) để loại bỏ phần lớn chất màu vàng. Chất rắn (có công thức 17) được làm khô trong chân không trong 2 giờ và tiếp theo để khô trong không khí trong 24 giờ. Lượng chất rắn này cân được 21g sau khi sấy ở 50°C trong chân không. Dịch lọc được cô và cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột (10% - 70% etyl axetat trong hexan) để tạo ra thêm 37g (hiệu suất kết hợp là 97%) hợp chất có công thức 17 ở dạng rắn màu vàng nhạt.

Ví dụ 19-3. Điều chế 1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-¹³C-perdeuteriometyltetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion, có công thức 18

Magie (3,53g, 147mmol), được rửa bằng dung dịch nước axit clohydric 5% và làm khô (50°C, 0,2mm Hg (26,6644Pa), 24 giờ), được đưa vào bình đáy tròn hai cổ có lắp thanh khuấy từ và bình ngưng. Bình này được nạp khí argon và tiếp theo ete khan (80ml) được bổ sung vào. Perdeuterio-¹³C metyl iodua (15,06g, 110,3mmol) được bổ sung từ từ vào magie trong ete, gây ra phản ứng tỏa nhiệt. Sau khi hỗn hợp phản ứng này được làm nguội, dịch nổi được chuyển sang dung dịch chứa hợp chất khô có công thức 17 (50°C, 0,2mm Hg (26,6644Pa), 15 giờ) (10,0g, 20,63mmol) trong THF khan (11) ở -50°C trong 20 phút. Nhiệt độ được phép nâng lên đến -40°C và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -40°C đến -25°C trong 4 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành, hỗn hợp này được pha loãng bằng EtOAc (11) ở -50°C và tiếp theo nước muối (300ml) được bổ sung từ từ vào. Lớp hữu cơ được tách và tiếp theo được rửa bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (300ml x 2) và làm khô bằng natri sulfat. Sau khi lọc và cô trong điều kiện áp suất giảm, cặn được hòa tan trong MeOH (250ml). Amoni florua (12g) và TBAF (400mg) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được khuấy ở 90°C trong 7 giờ và tiếp theo cô với silicagel (20g) trong điều kiện áp suất giảm. Sau khi sấy kỹ trong chân không, cặn thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột nhanh trên silicagel (tỷ lệ MeOH:CH₂Cl₂ nằm trong khoảng từ 1:20 đến 1:10) để tạo ra hợp chất có công thức 18 (5g, 46%) ở dạng rắn màu trắng. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm) 11,26 (s, 1H, NH), 7,65 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-6), 5,77 (d, 1H, J= 2,4 Hz, H-1'), 5,57 (d, 1H, J= 8,0 Hz, H-5), 5,46 (d, 1H, J= 5,2 Hz, HO-3'), 5,24 (d, 1H, J= 2,4 Hz, HO-2'), 5,14 (t, 1H, J= 5,6 Hz, HO-5'), 3,74-3,56 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5'').

Ví dụ 19-4. Điều chế ((2R,3R,4S,5R)-3-axetoxi-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-hydroxy-4-¹³C-perdeuteriometyltetrahydrofuran-2-yl)metyl axetat, có công thức 19

Axetic anhydrit (3ml) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 18 (5,00g, 19,1mmol) trong pyridin khan (100ml) ở nhiệt độ môi trường. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong 15 giờ, pha loãng bằng EtOAc (250ml), rửa bằng nước (50ml x 3), và làm khô bằng natri sulfat. Sau khi lọc và cô, cặn được

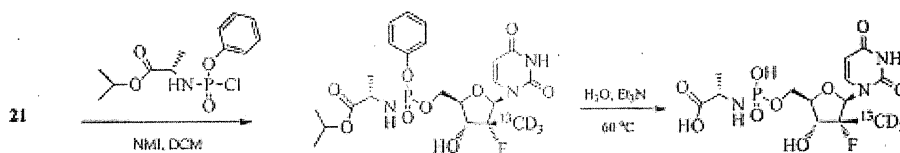
ting chế theo phương pháp sắc ký cột cực nhanh (0% - 5% MeOH trong CH₂Cl₂) để tạo ra hợp chất có công thức 19 (4,0g, 68%) ở dạng rắn màu xám.

Ví dụ 19-5. Điều chế ((2R,3R,4R,5R)-3-axetoxy-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1-(2H)-yl)-4-flu-4-¹³C-perdeuteriometyltetrahydrofuran-2-yl)metyl axetat, có công thức 20

DAST (1,33ml, 10,1mmol) được bổ sung từ từ vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 19 (2,33g, 6,73mmol) trong CH₂Cl₂ khan (60ml) ở -78°C. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 30 phút sau khi được để ở nhiệt độ môi trường. Thêm hai phản ứng ở quy mô 2,33g và một phản ứng ở quy mô 1,00g được thực hiện theo cùng cách này. Cả bốn hỗn hợp phản ứng được kết hợp, pha loãng bằng CH₂Cl₂ (300ml), và rửa bằng nước đá-nước (100ml x 2) và tiếp theo bằng dung dịch nước NaHCO₃ lạnh (100ml x 2). Sau khi sấy, lọc, và cô, cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột nhanh trên silicagel (0% - 50% EtOAc trong hexan, hợp chất đã được tạo ra với hiệu suất khoảng 48%) để tạo ra hợp chất có công thức 20 (2,0g, 24% trong tổng cộng 7,99g hợp chất có công thức 19) ở dạng rắn màu trắng. ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 8,27 (s, 1H, NH), 7,55 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-6), 6,17 (d, 1H, *J* = 18,8 Hz, H-1'), 5,78 (dd, 1H, *J* = 1,2, 8,4 Hz, H-5), 5,12 (dd, 1H, *J* = 9,6, 21,6 Hz, H-3'), 4,40-4,31 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,15 (s, 3H, CH₃).

Ví dụ 19-6. Điều chế 1-((2R,3R,4R,5R)-3-flu-4-hydroxy-5-(hydroxymetyl)-3-¹³C-perdeuteriometyltetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion, có công thức 21

n-butylamin (6ml) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 20 (2g, 5,74mmol) trong metanol (20ml). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 15 giờ và cô với silicagel trong chân không. Cặn thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột nhanh trên silicagel (0% - 10% MeOH trong CH₂Cl₂) để tạo ra hợp chất 21 (1,3g, 85%) ở dạng rắn màu trắng. ¹H NMR (CD₃OD) δ (ppm) 8,08 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-6), 6,13 (d, 1H, *J* = 18,4 Hz, H-1'), 5,70 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-5), 3,99 (d, 1H, *J* = 13,6 Hz, H-5'), 3,97-3,91 (m, 2H, H-3',4'), 3,80 (dd, 1H, *J* = 2,0, 12,8 Hz, H-5''), ESMS (M+1) theo tính toán 265, theo thử nghiệm 265.



Ví dụ 19-7. Điều chế (S)-isopropyl 2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-¹³C-perdeuteriometyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(phenoxy)phosphorylamino)propanoat, có công thức 22

Phosphorocloridat đã được tạo ra trước trong THF (1,0M, 2,35ml, 2,35mmol) được bổ sung nhỏ giọt ở 0°C vào dung dịch chứa nucleosit không được bảo vệ có công thức 21 (207mg, 0,783mmol) và N-metylimidazol (0,4ml, 5mmol) trong THF (4ml). Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ từ từ lên đến nhiệt độ môi trường trong 1 giờ và tiếp theo nước (1ml) và EtOAc (5ml) được bổ sung. Dung dịch hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri xitrat monobazơ bão hòa (2 x 2ml), dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (1 x 2ml), làm khô (MgSO₄) và cô trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột bằng silic dioxit bằng cách sử dụng dung dịch chứa 0% - 5% ⁱPrOH trong CH₂Cl₂ làm chất rửa giải để tạo ra phosphoramidat, có công thức 22 (216mg, 52%, hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang P theo tỷ lệ 1:1) ở dạng rắn màu trắng: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,54 (s, 1H), 7,56 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,40-7,35 (m, 2H), 7,23-7,18 (m, 3 H), 6,14-5,96 (m, 2H), 5,89 (dd, *J* = 5,6, 25,6 Hz, 1H), 5,55 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,85 (dq, *J* = 1,6, 6,0 Hz, 1H), 4,44-4,32 (m, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,06-3,98 (m, 1H), 3,86-3,70 (m, 2H), 1,30-1,08 (m, 9H); ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4,90, 4,77; LRMS (ESI) [M + H]⁺ theo tính toán C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534,5, theo thử nghiệm 534,4.

Ví dụ 19-8. Điều chế axit (2S)-2-((((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-¹³C-perdeuteriometyltetrahydrofuran-2-yl)metoxy)(hydroxy)phosphoryl)amino)propanoic, có công thức 23

Phosphoramidat có công thức 22 (147mg, 0,276mmol) được tạo huyền phù trong triethylamin (2ml) và nước (0,5ml), và đun nóng ở 60°C trong 30 giờ. Tiếp theo, các thành phần bay hơi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Chất thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột bằng silic dioxit nhờ rửa giải bằng dung dịch chứa 50% - 70% ⁱPrOH trong CH₂Cl₂, và tiếp theo bằng dung dịch chứa 0% - 20% NH₄OH trong ⁱPrOH để tạo ra hợp chất có công thức 23 ở dạng rắn màu trắng (95mg, 83%): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,98 (d, *J* = 19,2 Hz, 1H), 5,52 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,02-3,81 (m, 4H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); ³¹P NMR

(162 MHz, DMSO- d_6) δ 8,12; LRMS (ESI) $[M + H]^+$ theo tính toán $C_{12}^{13}CH_{17}D_3FN_3O_9P$ 416,3, theo thử nghiệm 416,4.

Tính chất của các mẫu có công thức R_p-4 , 4, và S_p-4

Các mẫu có công thức R_p-4 , 4, và S_p-4 được phân tích theo phương pháp nhiễu xạ bột bằng tia X (X-Ray powder diffraction - XRPD), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance - NMR), phổ hồng ngoại chuyển Fourier (Fourier Transform Infrared - FT-IR), đo nhiệt lượng quét vi phân (Differential Scanning Calorimetry - DSC), phân tích trọng lượng nhiệt (Thermal Gravimetric Analysis - TGA), thẩm hơi trọng lượng (Gravimetric Vapor Sorption - GVS), độ hòa tan trong nước nhiệt động (Thermodynamic Aqueous Solubility), và sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Sắc ký - HPLC).

Ví dụ 20. Phân tích nhiễu xạ bột bằng tia X

Các mẫu có công thức R_p-4 , 4, và S_p-4 được phân tích theo phương pháp nhiễu xạ bột bằng tia X (XRPD) theo chế độ sau.

a. Bruker AXS/Siemens D5000

Mẫu nhiễu xạ bột bằng tia X được gom trên thiết bị nhiễu xạ Siemens D5000 bằng cách sử dụng bức xạ Cu K α (40kV, 40mA), máy đo góc θ - θ , độ trệch của V20 và các khe tiếp nhận, bộ tạo đơn sắc phụ bằng graphit và bộ đếm nhấp nháy. Dụng cụ này được kiểm tra hoạt động bằng cách sử dụng chuẩn Corundum đã được xác nhận (NIST 1976). Phần mềm được sử dụng để gom dữ liệu là Diffrac Plus XRPD Commander phiên bản 2,3.1 và dữ liệu được phân tích và được thể hiện bằng cách sử dụng Diffrac Plus EVA phiên bản 11.0.0.2 hoặc phiên bản 13.0.0.2.

Các điều kiện của môi trường

Các mẫu được thử nghiệm trong điều kiện của môi trường được điều chế như các mẫu trên đĩa phẳng bằng cách sử dụng chính bột nhận được. Khoảng 35mg mẫu được xếp nhẹ nhàng vào khoang được cắt thành bao silicon nền zero được đánh bóng. Mẫu này được quay vòng trên mặt phẳng của chính nó trong quá trình phân tích. Chi tiết dữ liệu gom được là: góc nằm trong khoảng: từ 2 đến 42 $^{\circ}2\theta$; bước cách: 0,05 $^{\circ}2\theta$; và thời gian gom: 4 giây/bước.

b. Bruker AXS C2 GADDS

Các mẫu phân tích nhiễu xạ bột tia X được gom trên nhiễu xạ kế Bruker AXS C2 GADDS bằng cách sử dụng bức xạ Cu K α (40kV, 40mA), giai đoạn XYZ được tự động hóa, kính hiển vi video laze để định vị mẫu tự động và máy dò diện tích 2 chiều HiStar. Các bộ phận quang học tia X gồm gương nhiễu xạ Gobel đơn nhất kèm theo ống chuẩn trực lỗ 0,3mm.

Độ trệch của chùm tia, tức là kích thước hữu hiệu của chùm tia X đối với mẫu, là khoảng 4mm. Cách quét liên tục θ - θ được áp dụng đối với mẫu - khoảng cách bộ dò 20cm mà tạo ra khoảng 2θ hữu hiệu nằm trong khoảng từ $3,2^\circ$ đến $29,7^\circ$. Thông thường, mẫu này được chiếu chùm tia X trong 120 giây. Phần mềm được sử dụng để thu thập dữ liệu là GADDS đối với WNT 4.1.16 và dữ liệu được phân tích và thể hiện bằng cách sử dụng *Diffraction Plus* EVA phiên bản 9.0.0.2 hoặc phiên bản 13.0.0.2.

Các điều kiện của môi trường

Mẫu được phân tích trong điều kiện của môi trường được điều chế như các mẫu trên đĩa phẳng bằng cách sử dụng bột thu được chưa nghiền. Khoảng từ 1mg đến 2mg mẫu được dập nhẹ trên miếng thủy tinh để tạo ra bề mặt phẳng.

Nhiễu xạ bột tia X (XRPD)

Theo XRPD, hợp chất có công thức 4 được phát hiện là vô định hình (xem hình 1). Phân tích XRPD độ phân giải cao đối với hợp chất có công thức R_p -4 điều chế được theo Ví dụ 3 xác nhận chất rắn tinh thể thể hiện kiểu hình bột khác với hợp chất có công thức S_p -4 (điều chế được theo Ví dụ 4, Phương pháp 4), mà cũng được xác nhận là chất rắn tinh thể. Kết quả XRPD đối với hợp chất có công thức R_p -4 và hợp chất có công thức S_p -4 được thể hiện trong Bảng 1 và loại bỏ tất cả các pic thể hiện cường độ $\leq 5\%$ (hợp chất có công thức R_p -4) và $\leq 3\%$ (hợp chất có công thức S_p -4).

Bảng 1. Dữ liệu XRPD đối với hợp chất có công thức R_p -4 và S_p -4.

Dữ liệu XRPD đối với hợp chất có công thức R_p -4		Dữ liệu XRPD đối với hợp chất có công thức S_p -4 (dạng 1)	
Góc 2-Theta $^\circ$	Cường độ %	Góc 2-Theta $^\circ$	Cường độ %
6,616	51,1	4,900	6,8
7,106	40,5	5,190	19,8
8,980	30,0	7,501	100,0
11,020	21,7	8,355	4,1
11,559	77,1	8,965	7,7

25555

11,950	12,8	9,619	21,2
13,023	5,2	10,145	3,6
14,099	6,2	14,393	4,9
15,121	5,7	16,300	7,0
15,624	5,4	16,688	10,6
16,003	17,8	17,408	5,5
17,882	100,0	17,820	8,2
18,567	8,8	18,262	31,5
19,564	22,7	18,600	6,3
20,280	5,6	18,900	7,3
20,728	42,5	19,150	6,1
21,047	19,9	19,696	4,8
21,671	22,0	20,398	4,4
21,943	23,3	20,710	6,9
22,214	18,9	21,950	6,1
23,074	28,5	22,175	12,2
24,145	30,3	22,511	5,6
24,355	39,1	22,924	3,1
25,366	7,6	23,360	6,5
26,146	36,2	23,538	7,1
27,000	9,0	23,910	7,4
27,313	15,6	24,873	3,7
27,677	22,7	25,123	4,9
28,219	12,8	25,649	4,2
28,661	6,2	26,748	5,2
29,450	6,8	27,339	3,7
29,735	9,4	27,646	3,5
31,372	8,2	28,066	3,1
31,967	10,9	29,050	3,0
32,295	6,4	29,541	3,6
33,001	11,4	30,178	3,8
33,774	11,8	31,648	3,1
34,385	6,6	32,721	3,5
34,734	6,5	33,154	3,0

35,600	7,3	33,923	3,5
35,965	13,1	34,341	3,1
36,409	14,7	35,465	3,5
36,880	7,0	36,923	3,1
37,509	5,9	37,760	3,4
37,870	6,0	38,404	3,3
38,313	5,8	40,416	3,1
38,943	8,4		
40,093	6,6		
40,511	7,8		
41,429	6,5		

Mẫu hợp chất có công thức S_p-4 được nghiền bằng chày và cối, và tiếp đó cho lần lượt qua rây có cỡ lỗ $500\mu\text{m}$ và $250\mu\text{m}$ để tạo ra mẫu ở dạng bột mịn. Mẫu này được phân tích lại theo phương pháp XRPD độ phân giải cao, xác nhận không xảy ra thay đổi nào về dạng.

Ví dụ 21. Các thử nghiệm kết tinh đối với hợp chất có công thức S_p-4

Hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể thể hiện hiện tượng đa hình. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức S_p-4 ở dạng tinh thể và từng dạng đa hình của nó. Hợp chất có công thức S_p-4 có thể tồn tại ở ít nhất năm dạng đa hình, được gọi là các dạng từ 1 đến 5. Hơn thế nữa, hợp chất có công thức S_p-4 vô định hình cũng có thể được điều chế. Bước kết tinh thông thường hòa tan khoảng 100mg hợp chất có công thức S_p-4 trong thể tích thích hợp của dung môi kết tinh (axetonitril (5 đơn vị thể tích), clorofom (5 đơn vị thể tích), n-butyl axetat (7 đơn vị thể tích), diclometan (50 đơn vị thể tích), anisol (7 đơn vị thể tích), và hỗn hợp MTBE/heptan theo tỷ lệ 1:1 (50 đơn vị thể tích)) và tiếp theo làm bay hơi dung dịch này ở 5°C . Thu được các dạng tinh thể khác nhau, nhưng mỗi dạng, sau khi lọc và/hoặc sấy, tạo ra Dạng 1.

Các dạng 1, 2 và 3 lần lượt là dạng không được solvat hóa, DCM solvat theo tỷ lệ 1:1 và clorofom solvat theo tỷ lệ 1:1, như xác nhận được theo phân tích tia X tinh thể đơn nhất và phân tích XRPD. Các dạng 4 và 5 thu được từ bước kết tinh hợp chất có công thức S_p-4 lần lượt ra khỏi dung dịch axetonitril và anisol. Không thể thu thập đủ dữ liệu để xác định liệu các dạng 4 và 5 không được solvat hóa, được hydrat hóa

hay được solvat hóa vì không thu được các tinh thể đơn đủ chất lượng. Các dạng 4 và 5 biến đổi thành dạng 1 khi lọc. Hai dạng tinh thể bổ sung nữa thu được khi kết tinh hợp chất có công thức S_{p-4} ra khỏi n-butyl axetat ("BuAc) và dung dịch chứa methyl-butyl ete (MTBE) và heptan; khi lọc cả hai dạng tinh thể này chuyển hóa thành dạng 1. Các dạng 2 và 3 cũng chuyển hóa thành dạng 1 khi tách. Dạng 1 là dạng không được solvat hóa mà thể hiện đường thu nhiệt nóng chảy rộng với nhiệt độ bắt đầu 94,3°C và ΔH_{fus} bằng 24,0kJ/mol. Mẫu XRPD bổ sung của hợp chất có công thức S_{p-4} dạng 1 được thể hiện trên Hình 4.

Chuyển hóa hợp chất có công thức S_{p-4} dạng 1 thành hợp chất có công thức S_{p-4} dạng 6

Dạng 1 có thể được chuyển hóa thành dạng 6 theo ít nhất hai cách.

Thứ nhất, bằng cách để cho các tinh thể mịn của dạng 1 được tiếp xúc với hơi ẩm trong khí quyển trong vài ngày, monohydrat của dạng 1 được tạo ra với vẻ bên ngoài của gồm được hóa rắn. Sau khi nghiền monohydrat rắn này thành bột mịn, mẫu XRPD vẫn phù hợp với dạng 1. Sau khi để trong bình mở trong thời gian từ 6 đến 10 tuần, chất liệu đã được nghiền từ từ chuyển hóa thành dạng 6 là chất rắn khan. Dạng 1 là bền vững trong ít nhất 2 năm trong bình chứa đậy kín.

Theo cách khác, dạng 1 có thể được tạo huyền phù trong nước ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5mg/ml đến 50mg/ml ở nhiệt độ môi trường và sau vài giờ chuyển hóa thành dạng 6. Hiệu quả của quy trình chuyển hóa trong nước có thể tăng bằng cách đun nóng nước đến nhiệt độ để hòa tan nhiều hơn dạng 1 và để tăng độ chảy của phần hợp chất có công thức S_{p-4} không trộn lẫn ra khỏi gồm cứng thành dầu được tạo huyền phù ở nhiệt độ khoảng bằng hoặc cao hơn. Sau một thời gian, dạng 6 có thể bắt đầu kết tinh ra khỏi ở 50°C. Làm lạnh tiếp huyền phù này đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 10°C dẫn đến mức độ thu hồi chất rắn cao hơn. Bước kết tinh ra khỏi nước cũng loại bỏ tạp chất vết phân cực hơn, dẫn đến tổng độ tinh khiết cao hơn.

Việc hòa tan lại dạng 6 vào dung môi hữu cơ như diclometan hoặc axetonitril, tiếp theo kết tinh, tạo ra dạng 1, ngay cả khi tạo mầm bằng tinh thể dạng 6.

1,04 gam hợp chất có công thức S_{p-4} dạng 1 được nạp vào bình đáy tròn một cỡ loại dung tích 100ml khô có lắp vách ngăn cao su và thanh khuấy từ. Độ tinh khiết theo phân tích HPLC 99,7%. 40ml nước DI được nạp vào. Bắt đầu khuấy mạnh huyền

phù này trong khi đun nóng đến 50°C. Sau khi nhiệt độ đạt đến 50°C, dung dịch này gần như đồng nhất được giữ trong 60 phút, trong thời gian đó chất rắn bắt đầu kết tủa ra khỏi dung dịch, tạo ra huyền phù loãng. Huyền phù này được làm nguội đến 20°C trong 90 phút và giữ trong 16 giờ ở 20°C, tiếp theo giảm tiếp nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong 30 phút và giữ nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong 2,5 giờ. Huyền phù này được lọc trên bộ lọc bằng thủy tinh xốp có độ xốp trung bình và rửa bằng 10ml nước được làm lạnh bằng nước đá. Bánh lọc ướt được hút khô trong 2 giờ trước khi sấy trong lò chân không qua đêm trong 23 giờ ở 50°C. Tách được 0,88g (hiệu suất thu hồi 84,6%) hợp chất có công thức S_p-4 , dạng 6.

Dạng 6 có điểm nóng chảy theo thử nghiệm nằm trong khoảng từ 124,5°C đến 126°C.

Ví dụ 21-1. Hợp chất có công thức S_p-4 dạng 1

Danh mục pic của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 1 được thể hiện trong Bảng

2.

Góc 2-Theta °	Cường độ %
5,0	74,8
7,3	100,0
7,8	2,2
8,2	6,8
8,8	9,3
9,4	23,5
10,0	8,4
11,4	4,2
13,3	3,0
14,2	6,1
14,9	3,5
16,1	7,9
16,6	13,2
17,3	15,4
17,7	10,1
18,1	42,6

Góc 2-Theta °	Cường độ %
18,4	7,6
18,7	11,4
18,9	5,7
19,3	5,0
19,6	2,9
20,2	8,5
20,5	11,5
20,8	3,6
21,8	7,2
22,0	14,5
22,4	9,6
23,2	5,3
23,4	5,8
23,5	4,6
23,8	7,4
24,0	3,1
24,7	2,5
25,0	13,0
25,5	3,1
26,6	4,5
27,2	3,2
27,5	2,2
28,1	2,9
30,0	3,2

Ví dụ 21-2. Hợp chất có công thức S_p-4 dạng 2

Mẫu XRPD của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 2 được thể hiện trên Hình 5.

Danh mục pic của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 2 được thể hiện trong Bảng

3.

Góc 2-Theta °	Cường độ %
---------------	------------

Góc 2-Theta °	Cường độ %
4,9	44,1
5,1	19,1
6,9	62,1
8,7	6,8
9,8	28,6
10,1	10,4
13,7	7,0
16,7	3,1
19,5	8,9
19,8	45,5
20,1	18,6
20,4	3,6
20,6	25,6
20,9	15,9
21,1	10,9
22,1	3,4
24,6	38,7
24,7	100,0
25,1	61,2
26,1	53,3
39,0	6,3

Ví dụ 21-3. Hợp chất có công thức S_p-4 dạng 3

Mẫu XRPD của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 3 được thể hiện trên Hình 6.

Danh mục pic của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 3 được thể hiện trong Bảng

4.

Góc 2-Theta °	Cường độ %
5,0	10,0
6,9	23,3
9,8	22,6

19,7	34,8
20,6	100,0
21,8	10,5
24,6	65,3
34,7	4,1

Ví dụ 21-4. Hợp chất có công thức S_p-5 dạng 4

Mẫu XRPD của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 4 được thể hiện trên Hình 7.

Danh mục pic của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 4 được thể hiện trong Bảng 5.

Góc 2-Theta °	Cường độ %
5,0	29,8
6,8	100,0
8,2	4,8
8,7	5,2
9,9	3,8
13,7	1,7
14,9	4,8
19,9	22,5
20,4	2,1
20,6	20,0
20,9	20,0
24,7	3,4
24,9	29,9
25,1	1,5
36,8	3,1

Ví dụ 21-5. Hợp chất có công thức S_p-4 dạng 5

Mẫu XRPD của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 5 được thể hiện trên Hình 8.

Danh mục pic của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 5 được thể hiện Bảng 6.

Góc 2-Theta °	Cường độ %
5,2	52,9

6,6	100,0
7,1	25,9
9,7	12,1
10,4	16,4
13,4	11,4
15,7	25,8
19,1	31,1
19,9	12,9
20,0	9,0
21,3	3,5
25,0	22,3
25,6	2,3
26,3	5,9
26,9	2,0
31,7	2,1

Ví dụ 21-5. Hợp chất có công thức S_p-4 dạng 6

Mẫu XRPD của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 6 được thể hiện trên Hình 21.

Danh mục pic của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 6 được thể hiện trong bảng sau.

Góc 2-Theta °	khoảng cách d, Å	Cường độ %
6,08	14,51	66,7
8,2	10,77	62,1
10,38	8,52	29,8
10,85	8,14	10,4
12,17	7,26	12,0
12,7	6,96	66,4
13,73	6,44	14,9
14,1	6,27	13,8
15,91	5,57	3,1
16,83	5,26	8,7

17,17	5,16	19,7
17,66	5,01	56,02
17,95	4,93	37,7
18,97	4,72	59,0
19,1	4,64	14,3
19,41	4,57	37,2
19,8	4,48	46,0
20,11	4,41	68,8
20,82	4,26	100,0
21,81	4,07	36,8
22,03	4,03	7,4
23,03	3,86	14,2
23,26	3,82	21,6
23,64	3,76	6,3
23,89	3,72	7,0
24,73	3,6	3,3

Ví dụ 21-7. Hợp chất có công thức S_p-4 (Vô định hình)

Mẫu XRPD cho hợp chất có công thức S_p-4 vô định hình được thể hiện trên Hình 9.

Ví dụ 22. Phân tích tinh thể học tia X đối với hợp chất có công thức S_p-4 tinh thể đơn nhất và các solvat của nó

Ví dụ 22-1. Phân tích tinh thể học tia X đối với hợp chất có công thức S_p-4 tinh thể đơn nhất (dạng 1)

Hình 10 thể hiện cấu trúc tinh thể được chụp bằng tia X của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 1. Hình này thể hiện các phân tử dạng 1 dưới góc độ cấu trúc tinh thể thể hiện cách đánh số được áp dụng. Các elipsoit thay thế nguyên tử không đẳng hướng đối với các nguyên tử không phải là hydro được thể hiện ở mức độ xác suất 50%. Các nguyên tử hydro được thể hiện với bán kính nhỏ tùy hướng.

Phân giải cấu trúc thu được theo các phương pháp trực tiếp, hiệu chỉnh hồi quy bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ (full-matrix least-squares refinement) đối với F^2

với sự cân nhắc $w^{-1} = \sigma^2(F_0^2) + (0,0592P)^2 + (0,6950P)$, trong đó $P = (F_0^2 + 2F_c^2)/3$, các thông số thay thế không đẳng hướng, điều chỉnh độ hấp thụ theo kinh nghiệm bằng cách sử dụng các hàm điều hòa cầu, áp dụng trên thuật toán chia độ SCALE3 ABSPACK. Cuối cùng $wR^2 = \{\sum[w(F_0 - F_c)]/\sum[w(F_0^2)^2]^{1/2}\} = 0,0871$ đối với toàn bộ dữ liệu, R_1 thông thường = 0,0329 đối với các trị số F của 7090 phản xạ với $F_0 > 4\sigma(F_0)$, $S = 1,016$ đối với toàn bộ dữ liệu và 870 thông số. Cuối cùng Δ/σ (tối đa) 0,001, Δ/σ (trung bình), 0,000. Khác biệt cuối cùng nằm trong khoảng từ +0,534 đến -0,36 e Å⁻³.

Bảng 7. Thông số tinh thể đơn nhất dạng 1

Công thức phân tử	C ₂₂ H ₂₉ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Phân tử lượng	529,45				
Hệ tinh thể	Đơn tà				
Nhóm khoảng cách	<i>P</i> 2 ₁	<i>a</i>	20,0898(5) Å,	α	90°,
		<i>b</i>	6,10290(10) Å,	β	112,290(3)°,
		<i>c</i>	23,0138(6) Å,	γ	90°,
V	2610,79(10)Å ³				
Z	4				
<i>D_c</i>	1,347g.cm ⁻¹				
μ	1,475mm ⁻¹				
Nguồn, λ	Cu K α , 1,54178Å				
<i>F</i> (000)	1112				
<i>T</i>	100(1)K				
Tinh thể	Tấm không màu, 0,12 x 0,09 x 0,03 mm				
Dữ liệu đã được cắt đến	0,80Å				
θ_{\max}	74,48°				
Mức độ đầy đủ	99,4%				
Phản xạ	14854				
Phản xạ duy nhất	7513				
<i>R_{int}</i>	0,0217				

Ví dụ 22-2. Phân tích tinh thể học tia X đối với hợp chất có công thức S_p-4 tinh thể đơn nhất (dạng 2)

Hình 11 thể hiện cấu trúc tinh thể chụp bằng tia X của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 2. Hình này thể hiện các phân tử dạng 2 dưới góc độ cấu trúc tinh thể thể hiện cách đánh số được áp dụng. Các phân tử khác loại được phân tích theo cách đẳng hướng vì dữ liệu rất yếu. Các nguyên tử hydro không được thể hiện.

Phân giải cấu trúc thu được theo các phương pháp trực tiếp, hiệu chỉnh hồi quy bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ (full-matrix least-squares refinement) đối với F^2 với sự cân nhắc $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P)$, trong đó $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, các thông số thay thế không đẳng hướng, điều chỉnh độ hấp thụ theo kinh nghiệm bằng cách sử dụng các hàm điều hòa cầu, áp dụng trên thuật toán chia độ SCALE3 ABSPACK. Cuối cùng $wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,1883$ đối với toàn bộ dữ liệu, R_1 thông thường = 0,0741 đối với các trị số F của 2525 phản xạ với $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,05$ đối với toàn bộ dữ liệu và 158 thông số. Cuối cùng Δ/σ (tối đa) 0,000, Δ/σ (trung bình), 0,000. Khác biệt cuối cùng nằm trong khoảng từ +1,388 đến -0,967 e \AA^{-3} .

Bảng 8. Thông số tinh thể đơn nhất dạng 2

Công thức phân tử	$C_{23}H_{31}Cl_2FN_3O_9P$				
Phân tử lượng	614,38				
Hệ tinh thể	Đơn tà				
Nhóm khoảng cách	$P2_1$	a	12,8315(3) \AA ,	α	90° ,
		b	6,14530(10) \AA ,	β	$91,752(2)^\circ$,
		c	17,6250(4) \AA ,	γ	90° ,
V	1389,14(5) \AA^3				
Z	2				
D_c	1,469 g.cm^{-3}				
μ	3,196 mm^{-1}				
Nguồn, λ	Cu-K, 1,54178 \AA				
$F(000)$	640				
T	293(2)K				
Dữ liệu đã được cắt đến	0,80 \AA				

θ_{\max}	62,23°
Mức độ đầy đủ	91,1%
Phản xạ	3528
Phản xạ duy nhất	2562
R_{int}	0,0227

Ví dụ 22-3. Phân tích tinh thể học tia X đối với hợp chất có công thức S_p-4 tinh thể đơn nhất (dạng 2)

Hình 12 thể hiện cấu trúc tinh thể theo phân tích bằng tia X (ORTEP - không đẳng hướng) hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 2). Cấu trúc tinh thể của metylen clorua solvat có công thức S_p-4 (dạng 2), $C_{23}H_{31}N_3PO_9FCl_2$, tạo ra nhóm khoảng cách đơn tà $P2_1$ (sự không có mặt có hệ thống $0k0$: $k=l\bar{e}$) với $a=12,8822(14)\text{Å}$, $b=6,1690(7)\text{Å}$, $c=17,733(2)\text{Å}$, $\beta=92,045(3)^\circ$, $V=1408,4(3)\text{Å}^3$, $Z=2$ và $d_{\text{theo tính toán}}=1,449\text{g/cm}^3$. Dữ liệu cường độ tia X được gom trên thiết bị đo diện tích Rigaku Mercury CCD bằng cách sử dụng nguồn bức xạ Mo- K_α phát xạ đơn sắc bằng graphit ($\lambda=0,71073\text{Å}$) ở nhiệt độ 143K (-130,15°C). Việc ghi chỉ số ban đầu được thực hiện từ một loạt mười hai ảnh quay $0,5^\circ$ với thời gian phơi sáng là 30 giây. Tổng cộng 648 ảnh quay được gom với tinh thể đến khoảng cách bộ đo 35mm, góc lắc 2θ là -12° , chiều rộng quay $0,5^\circ$ và phơi sáng trong 30 giây: quét lần thứ 1 là quét ϕ từ 315° đến 525° ở $\omega=10^\circ$ và $\chi=20^\circ$; quét lần thứ 2 là quét ω từ -20° đến 5° ở $\chi=-90^\circ$ và $\phi=315^\circ$; quét lần thứ 3 là quét ω từ -20° đến 4° ở $\chi=-90^\circ$ và $\phi=135^\circ$; quét lần thứ 4 là quét ω từ -20° đến 5° ở $\chi=-90^\circ$ và $\phi=225^\circ$; quét lần thứ 5 là quét ω từ -20° đến 20° ở $\chi=-90^\circ$ và $\phi=45^\circ$. Ảnh quay được xử lý bằng cách sử dụng CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), tạo ra danh mục các trị số F^2 và $\sigma(F^2)$ không lấy trung bình, mà sau đó được chuyển sang gói chương trình CrystalStructure (CrystalStructure: Gói phân tích cấu trúc tinh thể, do Rigaku Corp. Rigaku/MSK (2002) cung cấp) để xử lý tiếp và phân giải cấu trúc trên máy tính Dell Pentium III. Đo được tổng cộng 7707 phản xạ trên khoảng $5,48 \leq 2\theta \leq 50,04^\circ$, $-14 \leq h \leq 15$, $-7 \leq k \leq 6$, $-19 \leq l \leq 21$ tạo ra 4253 phản xạ duy nhất ($R_{int} = 0,0180$). Dữ liệu cường độ được hiệu chỉnh đối với hiệu ứng Lorentz và hiệu ứng phân cực và đối với mức độ hấp thụ bằng cách sử dụng REQAB (mức độ truyền tối thiểu và tối đa 0,824, 1,000).

Cấu trúc được phân giải theo các phương pháp trực tiếp (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). *J Appl. Cryst.*, 32, 115-119). Việc hiệu chỉnh được thực hiện theo phương pháp bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ dựa trên F^2 bằng cách sử dụng SHELXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.*, A64, 112-122). Tất cả các phản xạ được sử dụng trong khi hiệu chỉnh. Sơ đồ cân nhắc được áp dụng là $w=1/[\sigma^2(F_0^2) + 0,0472P^2 + 0,4960P]$, trong đó $P = (F_0^2 + 2F_c^2)/3$. Các nguyên tử không là hydro được hiệu chỉnh theo cách không đẳng hướng và các nguyên tử hydro được hiệu chỉnh bằng cách sử dụng mô hình "cưỡi". Việc hiệu chỉnh được đồng quy theo $R_1=0,0328$ và $wR_2=0,0817$ đối với 4046 phản xạ mà $F > 4\sigma(F)$ và $R_1=0,0348$, $wR_2=0,0838$ và $GOF = 1,056$ đối với tất cả 4253 phản xạ độc nhất không bằng 0 và 358 biến số ($R_1 = \sum ||F_0| - |F_c|| / \sum |F_0|$; $wR_2 = \{\sum w (F_0^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_0^2)^2\}^{1/2}$; $GOF = \{\sum w (F_0^2 - F_c^2)^2 / (n - p)\}^{1/2}$; trong đó $n =$ số lượng phản xạ và $p =$ số lượng thông số được hiệu chỉnh). Δ/σ tối đa trong chu kỳ bình phương nhỏ nhất cuối cùng bằng 0,000 và hai pic nổi nhất trong phân tích khác biệt tối thiểu theo Fourier là +0,312 và -0,389 e/Å³. Do đó, thông số cấu trúc tuyệt đối Flack được hiệu chỉnh đến -0,06(6) xác nhận hóa học tỷ lệ của hợp chất nêu ở đề mục này.

Bảng 1 liệt kê thông tin về tế bào, các thông số thu thập dữ liệu, và dữ liệu hiệu chỉnh. Các thông số nhiệt đẳng hướng vị trí cuối cùng và đương lượng được thể hiện trong Bảng 2. Các thông số nhiệt không đẳng hướng được thể hiện trong Bảng 3. ("*ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations*". C.K. Johnson (1976) ORNL-5138.) thể hiện phân tử với 30% elipsoit nhiệt xác suất được thể hiện.

Bảng 9. Tóm tắt việc xác định cấu trúc của hợp chất Sp-4.CH₂Cl₂.

Công thức:	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ PO ₉ FCl ₂
Trọng lượng phân tử:	614,38
Nhóm tinh thể:	đơn tà
Nhóm khoảng cách:	P2 ₁ (#4)
Z	2
Hằng số tế bào:	
a	12,8822(14)Å

b	6,1690(7)Å
c	17,733(2)Å
β	92,045(3)°
V	1408,4(3)Å ³
μ	3,48 cm ⁻¹
kích thước tinh thể, mm	0,42 x 0,12 x 0,10
D _{theo tính toán}	1,449g/cm ³
F(000)	640
Bức xạ:	Mo-K α ($\lambda=0,71073$ Å)
khoảng 2 θ	5,48° - 50,04°
hkl thu thập được:	-14 \leq h \leq 15; -7 \leq k \leq 6; -19 \leq l \leq 21
Số lượng phản xạ đo được:	7707
Số lượng phản xạ duy nhất:	4253 (R _{int} =0,0180)
Số lượng phản xạ quan sát được	4046 (F>4 σ)
Số lượng phản xạ dùng trong khi hiệu chỉnh	4253
Số lượng thông số	358
R chỉ số (F>4 σ)	R ₁ =0,0328 wR ₂ =0,0817
R chỉ số (tất cả dữ liệu)	R ₁ =0,0348 wR ₂ =0,0838
GOF:	1,056
Các pic khác biệt cuối cùng, e/Å ³	+0,312, -0,389

Ví dụ 22-4. Phân tích tinh thể học tia X đối với hợp chất có công thức S_p-4 tinh thể đơn nhất (dạng 3)

Hình 13 thể hiện cấu trúc tinh thể được chụp bằng tia X của hợp chất có công thức S_p-4 dạng 3. Hình này thể hiện các phân tử của dạng 3 dưới góc độ cấu trúc tinh thể thể hiện cách đánh số được sử dụng. Elipsoit thay thế nguyên tử không đẳng hướng đối với các nguyên tử không phải là hydro được thể hiện ở mức độ xác suất 50%. Các nguyên tử hydro được thể hiện với bán kính nhỏ tùy hướng.

Phân giải cấu trúc thu được theo các phương pháp trực tiếp, hiệu chỉnh bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ đối với F^2 với sự cân nhắc $w^{-1} = \sigma^2(F_0^2) + (0,0512P)^2 + (0,6810P)$, trong đó $P = (F_0^2 + 2F_c^2)/3$, các thông số thay thế không đẳng hướng, hiệu chỉnh mức độ hấp thụ theo kinh nghiệm bằng cách sử dụng các hàm điều hòa cầu, áp dụng trên thuật toán chia độ SCALE3 ABSPACK. Cuối cùng $wR^2 = \{\sum[w(F_0^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_0^2)^2]^{1/2}\} = 0,0796$ đối với toàn bộ dữ liệu, R_1 thông thường = 0,0294 đối với các trị số F của 2486 phản xạ với $F_0 > 4\sigma(F_0)$, $S = 1,068$ đối với toàn bộ dữ liệu và 377 thông số. Cuối cùng Δ/σ (tối đa) 0,001, Δ/σ (trung bình), 0,000. Khác biệt cuối cùng nằm trong khoảng từ +0,211 và -0,334 eÅ³.

Bảng 10. Thông số tinh thể đơn nhất dạng 3

Công thức phân tử	C ₂₃ H ₃₀ Cl ₃ F ₁ N ₃ O ₉ P ₁				
Phân tử lượng	648,82				
Hệ tinh thể	Đơn tà				
Nhóm khoảng cách	<i>P21</i>	<i>a</i>	12,9257(4) Å,	α	90°;
		<i>b</i>	6,18080(10) Å,	β	96,399(2)°;
		<i>c</i>	18,0134(4) Å,	γ	90°;
V	1430,15(6)Å ³				
Z	2				
<i>D_c</i>	1,507g.cm ⁻¹				
μ	3,977mm ⁻¹				
Nguồn, λ	Cu-K α , 1,54178Å				
<i>F</i> (000)	672				
<i>T</i>	100(1)K				
Tinh thể	Hình kim không màu, 0,22 x 0,03 x 0,02mm				
Dữ liệu đã được cắt đến	0,80Å				
θ_{\max}	74,41°				
Mức độ đầy đủ	69,1%				
Phản xạ	3062				
Phản xạ duy nhất	2607				
<i>R_{int}</i>	0,0198				

Ví dụ 23. Độ ổn định ở nhiệt độ cao và độ ẩm tương đối

Mẫu hợp chất có công thức R_p-4 được bảo quản trong buồng ẩm ở 40°C và độ ẩm tương đối 75% trong một tuần, và mẫu này được phân tích lại theo phương pháp XRPD. Mẫu bột thu được đối với hợp chất có công thức R_p-4 cho thấy không có thay đổi đáng kể trong quá trình thử nghiệm, không quan sát được thay đổi nào về dạng chất rắn. Kết quả này hẳn là trái với mẫu có công thức 4, mà chảy rữa trong 16 giờ khi bảo quản ở 40°C và độ ẩm tương đối 75%. Trên thực tế, bản chất chảy rữa của hợp chất có công thức 4 được minh họa dưới đây. Mẫu hợp chất có công thức 4 được cho qua rây có cỡ lỗ $250\mu\text{m}$, sau đó các mẫu này được bảo quản ở 40°C /độ ẩm tương đối 75% và 25°C /độ ẩm tương đối 53% và việc quan sát bằng mắt thường được thực hiện sau các khoảng cách thời gian đều đặn. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 11. Độ ổn định của hợp chất có công thức 4 trong điều kiện độ ẩm tương đối cao.

Điều kiện	t = 1,5 giờ	t = 4,5 giờ	t = 6,5 giờ	t = 8,5 giờ	t = 73 giờ
40°C /độ ẩm tương đối 75%	Chảy rữa	-	-	-	-
25°C /độ ẩm tương đối 53%	Không chảy rữa	Chất rắn dính	Chảy rữa một phần	Chảy rữa gần như hoàn toàn	Chảy rữa

Khi bảo quản ở 40°C và độ ẩm tương đối 75%, mẫu hợp chất có công thức S_p-4 chảy rữa bên trong trong 16 giờ. Ví dụ, mẫu hợp chất có công thức S_p-4 được nghiền bằng chày và cối, và tiếp đó cho lần lượt qua các rây có cỡ lỗ $500\mu\text{m}$ và $250\mu\text{m}$ để tạo ra mẫu ở dạng bột mịn. Mẫu nguyên liệu này được bảo quản ở 40°C và độ ẩm tương đối 75% và 25°C và độ ẩm tương đối 53% và quan sát bằng mắt thường sau các khoảng cách thời gian đều đặn. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 12. Độ ổn định của hợp chất có công thức S_p-4 ở độ ẩm tương đối cao.

Điều kiện	t = 1,5 giờ	t = 4,5 giờ	t = 104 giờ
40°C /độ ẩm tương đối 75%	Không chảy rữa	Chảy rữa	-
25°C /độ ẩm tương đối 53%	Không chảy rữa	Không chảy rữa	Không chảy rữa

Phân tích mẫu theo phương pháp XRPD sau khi bảo quản ở 25°C và độ ẩm tương đối 53% trong 104 giờ cho thấy không có thay đổi đáng kể về nhiễu xạ đồ thu được chứng tỏ rằng không xảy ra thay đổi về dạng.

Ví dụ 24. Phổ biến đổi hồng ngoại Fourier (Fourier Transform - Infrared - FT-IR)

Dữ liệu thu được trên Perkin-Elmer Spectrum One có lắp phụ kiện lấy mẫu phản xạ toàn phần yếu dần (Attenuated Total Reflectance - ATR) vạn năng. Dữ liệu thu được và phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Spectrum phiên bản 5.0.1.

Phổ hồng ngoại thu được đối với hợp chất có công thức 4, R_p -4, và S_p -4 lần lượt được thể hiện trên các hình từ 5 đến 7. Các pic chọn lọc, theo bước sóng (cm^{-1}) được liệt kê dưới đây:

Hợp chất có công thức 4: ~1680, ~1454, ~1376, ~1205, ~1092, ~1023 (Hình 14);

Hợp chất có công thức R_p -4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (Hình 15); và

Hợp chất có công thức S_p -4 (dạng 1): ~1743, ~1713, ~1688, ~1454, ~1378, ~1208, ~1082 (Hình 16).

Ví dụ 25. Đo nhiệt lượng quét vi phân (Differential Scanning Calorimetry - DSC) Phân tích trọng lượng nhiệt (Thermo-Gravimetric Analysis - TGA)

Dữ liệu DSC được gom trên thiết bị TA Q2000 có lắp thiết bị lấy mẫu tự động 50 vị trí. Việc hiệu chỉnh nhiệt dung được thực hiện bằng cách sử dụng saphia và việc hiệu chỉnh năng lượng và nhiệt độ được thực hiện bằng cách sử dụng indi đã được xác nhận.

DSC theo nhiệt độ đã được điều chỉnh thường được thực hiện với 0,8mg đến 1,2mg mỗi mẫu, trong chảo nhôm có lỗ đục, bằng cách sử dụng tốc độ nung nóng cơ bản 2°C/phút và các thông số điều biến nhiệt độ $\pm 0,2^\circ\text{C}/\text{phút}$ và 40 giây. Duy trì việc sục nitơ khô với lượng 50ml/phút vào mẫu.

Phần mềm điều khiển thiết bị này là Advantage cho Q Series phiên bản 2.8.0.392 và Thermal Advantage phiên bản 4.8.3 và dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Universal Analysis phiên bản 4.3A.

Dữ liệu DSC gom được trên Mettler DSC 823e có lắp dụng cụ lấy mẫu tự động có 34 vị trí. Dụng cụ này được hiệu chỉnh năng lượng và nhiệt độ bằng cách sử dụng

indi đã được xác nhận. Thông thường, 0,8mg đến 1,2mg mỗi mẫu, trong chảo nhôm có lỗ đục, nung nóng với tốc độ nung nóng 10°C/phút từ 25°C đến 250°C. Duy trì việc sục khí nitơ với lượng 50ml/phút vào mẫu. Phần mềm điều khiển dụng cụ và phân tích dữ liệu là STAe phiên bản 9.20.

Dữ liệu DSC đối với hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 6) gom được bằng cách sử dụng DSC (TA Q2000), bằng cách sử dụng tốc độ gia nhiệt 10°C/phút trong dòng khí nitơ khô liên tục (100 ml/phút). Khoảng 2,2mg mẫu được cân chính xác và nung nóng trong chảo 'Tzero' được đậy nắp không kín. Dụng cụ này được hiệu chỉnh (enthalpi và nhiệt độ) bằng chuẩn indi và (nhiệt dung) bằng chuẩn saphia. Độ bất định được dự tính là khoảng $\pm 0,1^\circ\text{C}$ đối với nhiệt độ và $\pm 5\%$ đối với entalpi đo được. Phần mềm phân tích đa năng TA được sử dụng để đo nhiệt độ bắt đầu.

Dữ liệu TGA thu được trên a Mettler TGA/SDTA 851e có lắp bộ phận lấy mẫu tự động có 34 vị trí. Dụng cụ này được hiệu chỉnh nhiệt độ bằng cách sử dụng indi đã được xác nhận. Thông thường, 8mg đến 12mg mỗi mẫu được nạp vào nồi nấu nhôm đã được cân trước và nung nóng với tốc độ 10°C/phút từ nhiệt độ môi trường đến 350°C. Duy trì việc sục khí nitơ với lượng 50ml/phút đối với mẫu. Phần mềm điều khiển dụng cụ này và phân tích dữ liệu là STARe phiên bản 9.20.

Việc phân tích hợp chất có công thức 4 theo phương pháp DSC cho thấy một đường thu nhiệt rộng duy nhất với điểm bắt đầu ở 58,7°C (ΔH 14J/g) được xác nhận là do sự thả chùng phân tử trong quá trình chuyển hóa thủy tinh theo phân tích DSC được điều biến thêm (Hình 17). Việc phân tích hợp chất có công thức 4 theo phương pháp TGA cho thấy không hao hụt trọng lượng trước khi phân hủy trên 240°C, xác nhận nguyên liệu này không được solvat hóa. Do phân tích hợp chất có công thức 4 theo phương pháp XRPD xác nhận nguyên liệu này là vô định hình, phân tích DSC được điều biến được thực hiện để tính nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh, là 57°C.

Phân tích DSC cho thấy một đường thu nhiệt rõ rệt duy nhất với điểm bắt đầu ở 136,2°C (ΔH 76J/g) được xác nhận là nóng chảy bằng phương pháp hiển vi ở giai đoạn nóng. Xem hình 18. Phân tích hợp chất có công thức R_p-4 theo phương pháp TGA cho thấy không hao hụt trọng lượng trước khi phân hủy trên 240°C, xác nhận nguyên liệu này không được solvat hóa.

Phân tích hợp chất có công thức S_p-4 theo phương pháp DSC cho thấy một đường thu nhiệt rộng duy nhất với điểm bắt đầu ở $93,9^\circ\text{C}$ (ΔH 43 J/g) xác nhận là nóng chảy theo phương pháp hiển vi ở giai đoạn nóng. Xem hình 19. Phân tích hợp chất có công thức S_p-4 theo phương pháp TGA cho thấy không hao hụt trọng lượng trước khi phân hủy trên 240°C , xác nhận nguyên liệu này không được solvat hóa.

Phân tích hợp chất có công thức S_p-4 (dạng 6) theo phương pháp DSC cho thấy đường thu nhiệt rộng với điểm bắt đầu ở $120,7^\circ\text{C}$ (ΔH 79 J/g).

Ví dụ 26. Hấp thụ hơi bằng trọng lượng (gravimetric vapour sorption - GVS)

SMS DVS nội tại

Các đường đẳng nhiệt hấp thụ thu được bằng cách sử dụng thiết bị phân tích hấp thụ ẩm nội tại SMS DVS, được điều khiển bằng phần mềm SMS Analysis Suite. Nhiệt độ của mẫu được duy trì ở 25°C bằng cách điều khiển dụng cụ. Độ ẩm được kiểm soát bằng cách trộn dòng nitơ khô và dòng nitơ ướt, với tổng lưu tốc bằng 200ml/phút. Độ ẩm tương đối được đo bằng máy đo Rotronic đã được hiệu chỉnh (độ ẩm tương đối nằm trong khoảng động từ 1,0% đến 100%), nằm gần mẫu. Thay đổi về trọng lượng, (thả chùng khối lượng) của mẫu ở dạng hàm số của độ ẩm tương đối tính theo % được theo dõi liên tục bằng cân vi lượng (độ chính xác $\pm 0,005\text{mg}$).

Thông thường, 5mg đến 20mg mẫu được đưa vào trong rổ bằng lưới thép không gỉ đã được cân trong điều kiện môi trường. Mẫu này được nạp vào và được dỡ tải ở độ ẩm tương đối 40% và nhiệt độ 25°C (điều kiện trong phòng thông thường). Đường đẳng nhiệt hấp thụ ẩm được thực hiện như được nêu dưới đây (2 lần quét đối với 1 chu kỳ hoàn chỉnh). Đường đẳng nhiệt chuẩn được thực hiện ở 25°C trong điều kiện bước của độ ẩm tương đối là 10% ở độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 0,5% đến 90%.

Bảng 13. Các thông số theo phương pháp đối với các thử nghiệm nội tại SMS DVS

Thông số	Trị số
Hấp phụ – Quét 1	40 - 90
Giải hấp / Hấp phụ – Quét 2	90 – 0, 0 – 40
Bước cách (độ ẩm tương đối tính theo %)	10
Số lần quét	2
Lưu tốc (ml/phút)	200
Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	25

Độ ổn định (°C/phút)	0,2
Thời gian thấm hút (giờ)	6 giờ

Mẫu được thu hồi sau khi hoàn thành phân tích dòng đẳng nhiệt và được phân tích lại theo phương pháp XRPD.

Phân tích GVS cho thấy hợp chất có công thức R_p-4 không hút ẩm thể hiện khả năng hấp thụ thuận nghịch khoảng 0,2% trọng lượng nước từ độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 0% đến 90%. Việc phân tích lại mẫu theo phương pháp XRPD sau thử nghiệm GVS cho thấy không có thay đổi về dạng.

Mẫu hợp chất có công thức S_p-4 được nghiền bằng chày và cối, và tiếp đó lần lượt cho qua rây có cỡ lỗ 500 μ m và 250 μ m để tạo ra mẫu ở dạng bột mịn mà sau đó được phân tích bằng cách áp dụng phương pháp một chu kỳ cải biến. Mẫu này được lấy từ độ ẩm tương đối 40% (xấp xỉ độ ẩm của môi trường) đến độ ẩm tương đối 60%, thay cho 90% đối với phương pháp chuẩn, và tiếp theo quay vòng đến 0% là lại đến độ ẩm tương đối 40%. Phân tích này cho thấy hợp chất có công thức S_p-4 không hút ẩm cho đến độ ẩm tương đối 60%, với mức hấp thụ thuận nghịch ~0,2% trọng lượng nước từ độ ẩm tương đối 0% đến độ ẩm tương đối 60%.

Ví dụ 27. Độ hòa tan nhiệt động trong nước

Độ hòa tan trong nước được xác định bằng cách tạo huyền phù một lượng đủ của hợp chất trong nước để tạo ra nồng độ cuối cùng tối đa ≥ 10 mg/ml dạng gốc của hợp chất. Huyền phù này được cân bằng ở 25°C trong 24 giờ, tiếp theo độ pH được đo. Sau đó, huyền phù này được lọc qua bộ lọc bằng sợi thủy tinh C vào đĩa loại 96 lỗ. Tiếp theo, dịch lọc được pha loãng bằng yếu tố 101. Việc định lượng được thực hiện theo phương pháp HPLC có quy chiếu đến dung dịch chuẩn chứa khoảng 0,1mg/ml trong DMSO. Các thể tích khác nhau của dung dịch mẫu chuẩn, dung dịch mẫu được pha loãng và dung dịch mẫu không được pha loãng được phun vào. Độ hòa tan được tính toán bằng cách sử dụng diện tích pic xác định được theo tích phân của pic tìm thấy được ở cùng thời gian duy trì như pic chính trong lần phun chuẩn.

Bảng 14. Thông số theo phương pháp HPLC để đo độ hòa tan

Loại phương pháp	Pha đảo và rửa giải theo gradien
Cột:	Phenomenes Luna, C18(2) 5 μ m 50 x 4,6 mm

Nhiệt độ cột (°C)	25		
Thể tích phun chuẩn (μl):	1, 2, 3, 5, 7, 10		
Thể tích phun thử nghiệm (μl):	1, 2, 3, 10, 20, 50		
Đo: Bước sóng, rộng (nm):	260, 80		
Lưu tốc (ml/phút)	2		
Pha A	0,1% TFA trong nước		
Pha B	0,085% TFA trong axetonitril		
Lịch trình	Thời gian (phút)	% Pha A	% Pha B
	0,0	95	5
	1,0	80	20
	2,3	5	95
	3,3	5	95
	3,5	95	5
	4,4	95	5

Phân tích được thực hiện trong các điều kiện nêu trên trên hệ Agilent HP1100 có lắp thiết bị dò mảng diot và bằng cách sử dụng phần mềm ChemStation phiên bản B.02.01 –SR1 .

Bảng 15. Kết quả hòa tan trong nước đối với hợp chất có công thức R_p-4 , 4 , và S_p-4 .

Mẫu	Độ pH của hỗn hợp không được lọc	Độ hòa tan / Nhận xét mg.ml ⁻¹
R_p-4	7,12	1,58 Huyền phù
4	7,03	6,11 Chất rắn còn sót lại
S_p-4	6,88	5,65 Chất rắn còn sót lại

Ví dụ 28. Xác định độ tinh khiết hóa học theo phương pháp HPLC

Các điều kiện HPLC khác nhau có thể được sử dụng để xác định độ tinh khiết hóa học của các hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này. Một ví dụ này được bộc lộ nêu trên liên quan đến các thử nghiệm về độ hòa tan nhiệt động trong nước. Một ví dụ khác được bộc lộ dưới đây.

Các điều kiện HPLC:

Sắc ký lỏng:

Mô đun tách Waters Alliance 2695, bộ dò PDA Waters 2996

	và phần mềm Waters Empower 2 (phiên bản 6.00)	
Cột:	Phenomenex Luna C18(2); 4,6 x 50mm; 3 μ m	
Lưu tốc:	1,2ml/phút	
Thể tích phun:	10 μ l	
Pha động:	Dung môi A: 95% nước với 5% metanol và 10mM amoni axetat; độ pH~5,3	
	Dung môi B: MeOH với 10mM amoni axetat	
Gradien:	giữ ở 0%B	3 phút
	0-47%B	từ 3 phút đến 4 phút
	giữ ở 47%B	từ 4 phút đến 10 phút
	47%-74%B	từ 10 phút đến 11 phút
	giữ ở 74%B	từ 11 phút đến 13,5 phút
	đưa trở lại 0%B	từ 13,5 phút đến 13,6 phút
	giữ ở 0%B	từ 13,6 phút đến 15,5 phút

Trong các điều kiện này, độ tinh khiết của hợp chất có công thức 4, R_p -4, và S_p -4 được xác định lần lượt là ~99,6, ~99%, và ~99,5%. Cần phải lưu ý rằng có thể đạt được độ tinh khiết cao hơn bằng cách tối ưu hóa các phương pháp nêu trên.

Việc xem xét các nhiễu xạ đồ XRPD cho thấy rằng hai chất đồng phân không đối quang dạng đơn tinh thể này tạo ra các mẫu XRPD khác nhau hoàn toàn. Ngoài ra, có khác biệt rõ ràng về điểm nóng chảy của hai chất đồng phân không đối quang dạng tinh thể này, trong đó hợp chất có công thức R_p -4 có điểm bắt đầu cao hơn hợp chất có công thức S_p -4 (136°C so với 94°C).

Ví dụ 29. Các phương pháp tách khác

Phương pháp tách SFC sau (điều kiện được nêu dưới đây) tách một cách thích hợp hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang, hợp chất có công thức R_p -4 và S_p -4.

Phương pháp điều chế:	Phương pháp phân tích:
Chiralpak AS-H (2 x 25cm) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25 x 0,46cm)
20% metanol/CO ₂ (100 bar (10 ⁷ Pa))	20% metanol/CO ₂ (100 bar (10 ⁷ Pa))
50ml/phút, 220nm	3ml/phút, 220nm
Nồng độ: 260mg/30ml metanol, thể tích phun: 1,5ml	

Phương pháp tách SFC sau (các điều kiện nêu dưới đây) tách một cách thích hợp hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang có công thức R_p-4 và S_p-4 .

Phương pháp điều chế:	Phương pháp phân tích:
Chiralpak IA (2 x 15cm) 802091	Chiralpak IA (15 x 0,46cm)
30% isopropanol (0,1%DEA)/CO ₂ , 100 bar (10 ⁷ Pa)	40% metanol (DEA)/CO ₂ , 100 bar (10 ⁷ Pa)
60ml/phút, 220nm	3ml/phút, 220nm
thể tích phun: 2ml, 20mg/ml metanol	

Bảng 16. Tóm tắt kết quả từ mẽ xác định tính chất của các hợp chất có công thức R_p-4 , 4, và S_p-4 .

Phân tích	R_p-4	4	S_p-4
Proton NMR	Chất đồng phân không đối quang đơn	1:1 Hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang	Chất đồng phân không đối quang đơn
XRPD	Tinh thể – khác S_p-4	Vô định hình	Tinh thể – khác R_p-4
DSC	Đường thu nhiệt; nóng chảy -136°C	Đường thu nhiệt; 59°C	Đường thu nhiệt; nóng chảy - 94°C
TGA	Không hao hụt khối lượng, phân hủy >240°C	Không hao hụt khối lượng, phân hủy >240°C	Không hao hụt khối lượng, phân hủy >240°C
IR	Như trên	Như trên	Như trên
Độ hòa tan trong nước (mg.ml ⁻¹)	1,58	6,11	5,65
Độ tinh khiết theo phân tích HPLC	96,9%	99,6%	99,5%
40°C/độ ẩm tương đối 75%	Không thay đổi dạng	Chảy rữa bên trong 1,5 giờ	Chảy rữa bên trong 4,5 giờ
25°C/độ ẩm tương đối 53%	-	Chảy rữa	Không thay đổi dạng

GVS	Không hút ẩm đến độ ẩm tương đối 90%	-	Không hút ẩm đến độ ẩm tương đối 60%
-----	--------------------------------------	---	--------------------------------------

Ví dụ 30. Phân tích hợp chất có công thức 8 (chất đồng phân S_p) theo phương pháp tinh thể học tia X

Hợp chất có công thức 8 (chất đồng phân S_p), $C_{18}H_{21}N_2PO_7$, kết tinh trong nhóm khoảng cách đơn tà $P2_1$ (sự không có mặt có hệ thống $0k0$: $k=l\bar{e}$) với $a=5,3312(4)\text{\AA}$, $b=15,3388(8)\text{\AA}$, $c=23,7807(13)\text{\AA}$, $\beta=92,891(3)^\circ$, $V=1942,2(2)\text{\AA}^3$, $Z=4$, và $d_{\text{theo tính toán}}=1,397\text{g/cm}^3$. Dữ liệu cường độ tia X được gom trên thiết bị đo diện tích Bruker APEXII CCD bằng cách sử dụng bức xạ Mo- $K\alpha$ phát xạ đơn sắc bằng graphite ($\lambda=0,71073\text{\AA}$) ở nhiệt độ $100(1)\text{K}$. Hình 20A và hình 20B thể hiện các phân tử lần lượt được đánh số 1 và 2, của đơn vị không đối xứng.

Việc ghi chỉ số ban đầu được thực hiện từ ba mươi sáu khung quay $0,5^\circ$ với thời gian tiếp cận 30 giây. Gom được tổng cộng 3608 khung với khoảng cách từ tinh thể đến bộ đo là 70,00mm, chiều rộng quay $0,5^\circ$ thời gian tiếp cận 20 giây:

loại quét	2θ	ω	φ	χ	khung
φ	-35,50	279,40	27,32	48,96	725
φ	24,50	22,31	35,56	69,08	692
ω	-13,00	321,68	247,79	69,08	95
φ	34,50	204,08	28,21	-92,80	293
φ	-30,50	310,60	214,10	54,21	361
φ	32,00	304,67	24,47	50,72	722
φ	-35,50	122,14	316,59	-78,84	720

Các khung quay được tích hợp bằng cách sử dụng SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) tạo ra danh mục các trị số F^2 và $\sigma(F^2)$ không lấy trung bình, sau đó chuyển sang gói chương trình SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) để xử lý tiếp và phân tích cấu trúc trên máy tính Dell Pentium 4. Đo được tổng cộng 6909 phản xạ trên khoảng $1,58 \leq \theta \leq 25,09^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-18 \leq k \leq 18$, $-28 \leq l \leq 28$ tạo ra 6909

phản xạ duy nhất ($R_{int} = 0,0581$). Dữ liệu cường độ được hiệu chỉnh đối với hiệu ứng Lorentz và hiệu ứng phân cực và đối với hấp thụ bằng cách sử dụng SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany.) (mức độ truyền tối thiểu và tối đa 0,6093, 0,7452).

Cấu trúc được phân giải theo các phương pháp trực tiếp (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64,1 12-122.)). Việc hiệu chỉnh theo phương pháp bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ dựa trên F^2 bằng cách sử dụng SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64, 112-122.). Tất cả các phản xạ được sử dụng trong khi hiệu chỉnh. Sơ đồ cân nhắc được sử dụng là $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0000P)^2 + 14,0738P]$, trong đó $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Các nguyên tử không là hydro được hiệu chỉnh theo cách không đẳng hướng và các nguyên tử hydro được hiệu chỉnh bằng cách sử dụng mẫu cầu. Việc hiệu chỉnh được đồng quy theo $R1 = 0,0847$ và $wR2 = 0,1899$ trong 6173 phản xạ quan sát được, trong đó $F > 4\sigma(F)$ và $R1 = 0,0963$ và $wR2 = 0,1963$ và $GOF = 1,119$ đối với tổng cộng 6909 phản xạ đơn nhất không phải là zero và 512 biến số ($R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$; trong đó n = số lượng phản xạ và p = số lượng thông số được hiệu chỉnh). Δ/σ tối đa trong chu kỳ cuối cùng của bình phương nhỏ nhất là 0,000 và hai pic nổi nhất trong khác biệt Fourier cuối cùng là +0,402 và -0,559e/Å³. Hình 20A và hình 20B là ORTEP (elipsoit nhiệt xác suất 30%) của phân tử 1 và phân tử 2 của đơn vị không đối xứng.

Bảng 17. Tóm tắt việc xác định cấu trúc của hợp chất có công thức 8 (chất đồng phân S_p)

Công thức theo thử nghiệm	$C_{23}H_{30}Cl_3F_1N_3O_9P_1$
Phân tử lượng	648,82
Nhiệt độ	100(1)K
Bước sóng	0,71073 Å
Hệ tinh thể	Đơn tà
Nhóm khoảng cách	$P2^1$
Các hằng số tế bào:	
a	5,3312(4) Å,
b	15,3388(8) Å,

c	23,7807(13) Å,
β	92,891(3)°
Thể tích	1942,2(2)
Z	4
Mật độ (theo tính toán)	1,397Mg/m ³
Hệ số hấp thụ	0,185mm ⁻¹
F(000)	856
Kích thước tinh thể	0,40 x 0,10 x 0,08mm ³
Khoảng theta để gom dữ liệu	1,58 đến 25,09°
Khoảng chỉ số	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Số lượng phản xạ thu được	6909
Số lượng phản xạ độc lập	6909 [R(int) = 0,0581]
Mức độ đầy đủ đến theta = 25,09°	99,6%
Hiệu chỉnh hấp thụ	Bán thử nghiệm từ các đương lượng
Mức chuyển tối đa và tối thiểu	0,7452 và 0,6093
Phương pháp hiệu chỉnh	bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ đối với F ²
Dữ liệu/giới hạn/thông số	6906 / 1 / 512
Sự phù hợp đối với F ²	1,119
Chỉ số R cuối cùng [I > 2sigma(I)]	R1 = 0,0847, wR2 = 0,1899
Chỉ số R (tất cả dữ liệu)	R1 = 0,0963, wR2 = 0,1963
Thông số cấu trúc tuyệt đối	0,1(2)
Pic và lỗ khác biệt lớn nhất	0,402 và -0,559 e.Å ⁻³

Ví dụ 32. Phân tích (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat theo phương pháp tinh thể học tia X

(S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)phosphoryl)-amino)propanoat, C₁₈H₁₇NPO₅F₅, kết tinh trong nhóm khoảng cách tam tà P1 với a = 5,2641(6)Å, b = 12,0548(13)Å, c = 16,4307(15)Å, α = 74,960(4)°, β = 83,959(4)°, γ = 80,275(4)°, V = 990,40(18)Å³, Z = 2, và d_{theo tính toán} = 1,520g/cm³. Dữ liệu cường độ tia X được gom trên thiết bị đo diện tích Bruker APEXII CCD bằng cách sử dụng bức xạ Mo-Kα phát

xạ đơn sắc bằng graphit ($\lambda = 0,71073\text{\AA}$) ở nhiệt độ 143(1)K. Việc ghi chỉ số ban đầu được thực hiện từ ba mươi sáu khung quay $0,5^\circ$ với thời gian tiếp cận 20 giây. Thu được tổng cộng 3593 khung với khoảng cách từ tinh thể đến bộ dò là 37,600mm, chiều rộng quay $0,5^\circ$ và thời gian tiếp cận 20 giây:

kiểu quét	2θ	ω	φ	χ	(số?) khung
φ	-15,50	258,48	-351,72	19,46	739
φ	-20,50	-17,45	-37,67	-73,06	725
ω	-10,50	-53,05	-87,93	99,72	80
φ	19,50	-32,21	-88,94	36,30	219
ω	-10,50	-14,33	80,80	-60,33	122
ω	17,00	-38,90	-41,64	83,36	116
ω	17,00	-37,89	-175,56	82,07	114
φ	19,50	59,55	-11,29	-26,26	739
φ	-10,50	318,39	-335,56	52,47	739

Khung quay được tích hợp bằng cách sử dụng SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.), tạo ra danh mục trị số F^2 và $\sigma(F^2)$ không lấy trung bình, mà sau đó được chuyển sang gói phần mềm SHELXTL (Bruker (2009) SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) để xử lý tiếp và phân tích cấu trúc trên Dell Pentium 4. Đo được tổng cộng 17880 phản xạ trên khoảng $1,77 \leq \theta \leq 25,12^\circ$, $-6 \leq h \leq 6$, $-14 \leq k \leq 14$, $-19 \leq l \leq 19$ tạo ra 6897 phản xạ duy nhất ($R_{int} = 0,0212$). Dữ liệu cường độ được hiệu chỉnh đối với hiệu ứng Lorentz và hiệu ứng phân cực và đối với hấp thụ bằng cách sử dụng SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany.) (mức độ truyền tối thiểu và tối đa 0,6887, 0,7452).

Cấu trúc được phân giải theo các phương pháp trực tiếp (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64, 112-122.)). Việc hiệu chỉnh được thực hiện theo phương pháp bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ dựa trên F^2 bằng cách sử dụng SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* A64, 112-122.). Tất cả các phản xạ được sử dụng trong khi hiệu chỉnh. Sơ đồ cân nhắc được sử dụng là $w=1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0344P)^2 + 0,1102P]$, trong đó $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Các nguyên tử

không là hydro được hiệu chỉnh theo cách không đẳng hướng và các nguyên tử hydro được hiệu chỉnh bằng cách sử dụng mẫu cuối. Việc hiệu chỉnh được đồng quy theo $R1 = 0,0259$ và $wR2 = 0,0609$ trong 6527 theo thử nghiệm phản xạ mà $F > 4\sigma(F)$ và $R1 = 0,0284$ và $wR2 = 0,0621$ và $GOF = 1,040$ đối với tổng cộng 6897 phản xạ không zero độc nhất và 548 biến số. ($R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$; $GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2}$; trong đó $n =$ số lượng phản xạ và $p =$ số lượng thông số được hiệu chỉnh). Δ/σ tối đa trong chu kỳ cuối cùng của bình phương nhỏ nhất là 0,001 và hai pic nổi nhất về khác biệt Fourier cuối cùng là +0,254 và -0,236 e/Å³. Hình 22A và hình 22B là ORTEP (30% elipsoit nhiệt xác suất) của phân tử 1 và phân tử 2 của đơn vị không đối xứng.

Bảng 18. Tóm tắt xác định cấu trúc (S)-isopropyl 2-(((S)-(perflophenoxy)(phenoxy)-phosphoryl)amino)propanoat

Công thức theo thử nghiệm	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ PO ₅ F ₅
Trọng lượng phân tử	453,30
Nhiệt độ	149(1)K
Bước sóng	0,71073 Å
Hệ tinh thể	tam tà
Nhóm khoảng cách	P1
Các hằng số tế bào:	
<i>a</i>	5,2641(6) Å,
<i>b</i>	12,0548(13) Å,
<i>c</i>	16,4307(15) Å,
α	74,960(4)°
β	83,959(4)°
γ	80,275(4)°
Thể tích	990,40(18)Å ³
Z	4
Mật độ (theo tính toán)	1,520Mg/m ³
Hệ số hấp thụ	0,216mm ⁻¹
F(000)	464
Kích thước tinh thể	0,45 x 0,05 x 0,04 mm ³

Khoảng theta để gom dữ liệu	1,77 đến 25,12°
Khoảng chỉ số	$-6 \leq h \leq 6, -14 \leq k \leq 14, -19 \leq l \leq 19$
Số lượng phản xạ thu được	17880
Số lượng phản xạ độc lập	6897 [R(int) = 0,0212]
Mức độ đầy đủ đến theta = 25,12°	99,5%
Hiệu chỉnh hấp thụ	bán thực nghiệm từ các đương lượng
Mức chuyển tối đa và tối thiểu	0,7452 và 0,6887
Việc hiệu chỉnh phương pháp	bình phương nhỏ nhất ma trận đầy đủ F ²
Dữ liệu/giới hạn/thông số	6897 / 3 / 548
Sự phù hợp đối với F ²	1,040
Chỉ số R cuối [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0259, wR2 = 0,0609
R chỉ số (tất cả dữ liệu)	R1 = 0,0284, wR2 = 0,0621
Thông số cấu trúc tuyệt đối	-0,01(5)
Pic và lỗ khác biệt lớn nhất	0,254 và -0,236 e.Å ⁻³

Ví dụ 33. Hoạt tính sinh học

Các tế bào chứa đơn vị sao chép được cấy ở mật độ 3.000 tế bào/lỗ (50µl) trong các đĩa trắng/mờ đục loại 96 lỗ, hoặc 1.500 tế bào/lỗ (25µl) trong các đĩa trắng/mờ đục loại 384 lỗ. 50µl 2X hợp chất được bổ sung vào đĩa loại 96 lỗ hoặc 25 µl 2X hợp chất được bổ sung vào đĩa loại 384 lỗ. Các đĩa này được ủ ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂ được làm ẩm trong 4 ngày. Sau khi ủ, chất phản ứng Bright-Glo (50µl, đối với đĩa loại 96 lỗ, hoặc 25µl đối với đĩa loại 384 lỗ) được bổ sung vào để đo gen thông báo luxiferaza của con đom đóm nhằm sao chép HCV (virut gây bệnh viêm gan C). Mức độ ức chế theo phần trăm được tính toán theo đối chứng không sử dụng thuốc.

Hợp chất	Hoạt tính sao chép HCV (µM)
4	0,58
R _p -4	2,87
S _p -4	0,13

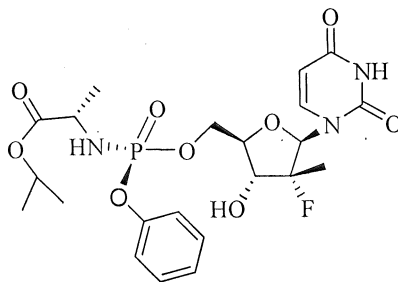
Hợp chất có công thức R_p-4 và S_p-4 được chứng minh là có khoảng kiểu di truyền rộng. Ví dụ, cả hai dạng này đều thể hiện hoạt tính kháng virus gây bệnh viêm gan C, kiểu di truyền 1-4.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này là đơn tiếp theo của đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/783,680 nộp ngày 20 tháng 5 năm 2010, mà yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ 61/179,923, nộp ngày 20 tháng 5 năm 2009, và 61/319,513, nộp ngày 31 tháng 3 năm 2010, đối tượng của các đơn này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Đối tượng của các đơn yêu cầu cấp patent US 12/783,680 và 12/053,015 và đơn tạm thời yêu cầu cấp patent US. 61/179,923, nộp ngày 20 tháng 5 năm 2009, và 61/319,513, nộp ngày 31 tháng 3 năm 2010, được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Đối tượng của tất cả các tài liệu được trích dẫn được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trong trường hợp nghĩa của thuật ngữ đã được đưa vào đây mâu thuẫn với nghĩa của thuật ngữ được định nghĩa trong bản mô tả này, thì nghĩa của thuật ngữ trong bản mô tả này được ưu tiên hơn nghĩa của các thuật ngữ đã được đưa vào.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể có công thức Sp-4:



Sp-4

có góc phản xạ 2θ theo XRPD ở khoảng 6,1, 8,2, 10,4, 12,7, 17,2, 17,7, 18,0, 18,8, 19,4, 19,8, 20,1, 20,8, 21,8, và 23,3.

2. Hợp chất (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể theo điểm 1 còn có góc phản xạ 2θ theo XRPD ở khoảng 6,08, 8,2, 10,38, 10,85, 12,17, 12,7, 13,73, 14,1, 15,91, 16,83, 17,17, 17,66, 17,95, 18,79, 19,1, 19,41, 19,8, 20,11, 20,82, 21,81, 22,03, 23,03, 23,26, 23,64, 23,89 và 24,73

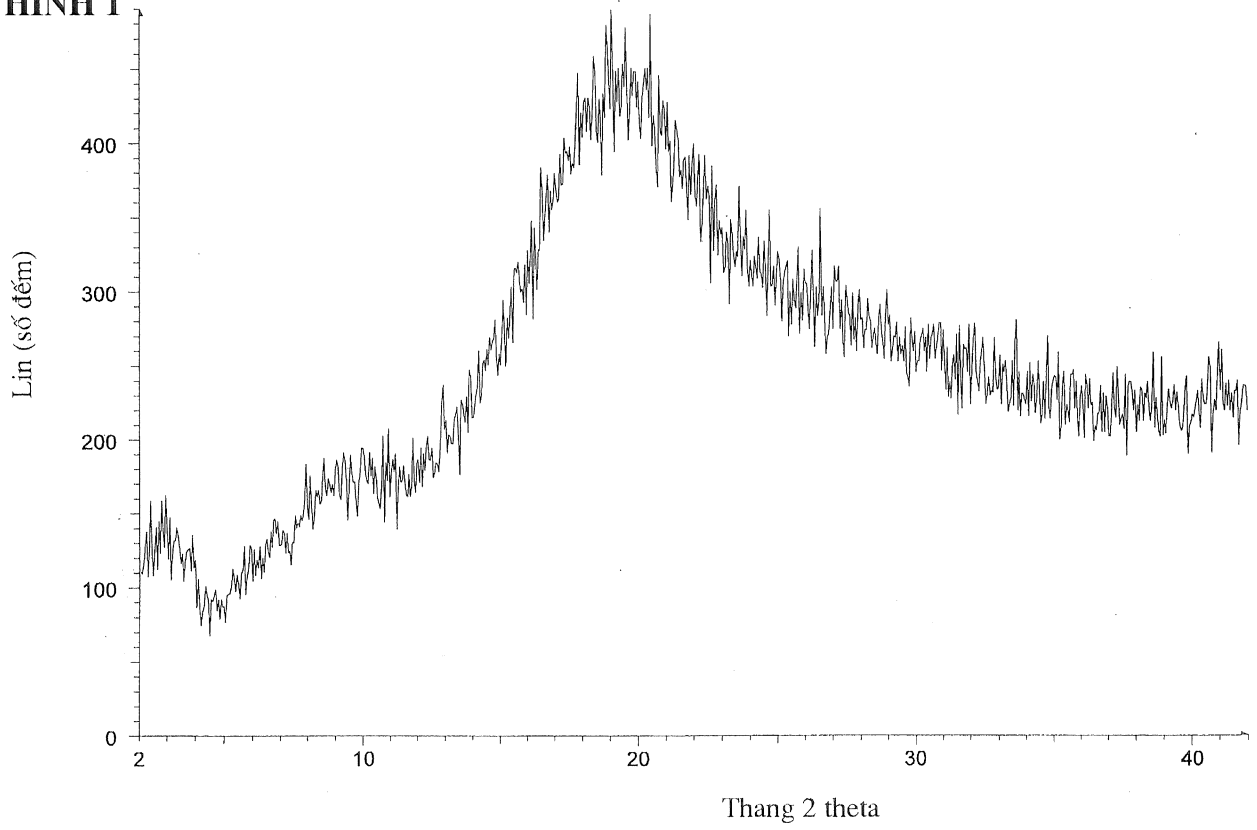
có cường độ (%) tương ứng 66,7, 62,1, 29,8, 10,4, 12,0, 66,4, 14,9, 13,8, 3,1, 8,7, 19,7, 56,2, 37,7, 59,0, 14,3, 37,2, 46,0, 68,8, 100,0, 36,8, 7,4, 14,2, 21,6, 6,3, 7,0 và 3,3.

3. Dược phẩm chứa (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể theo các điểm 1 hoặc 2 và dung môi dược dụng.

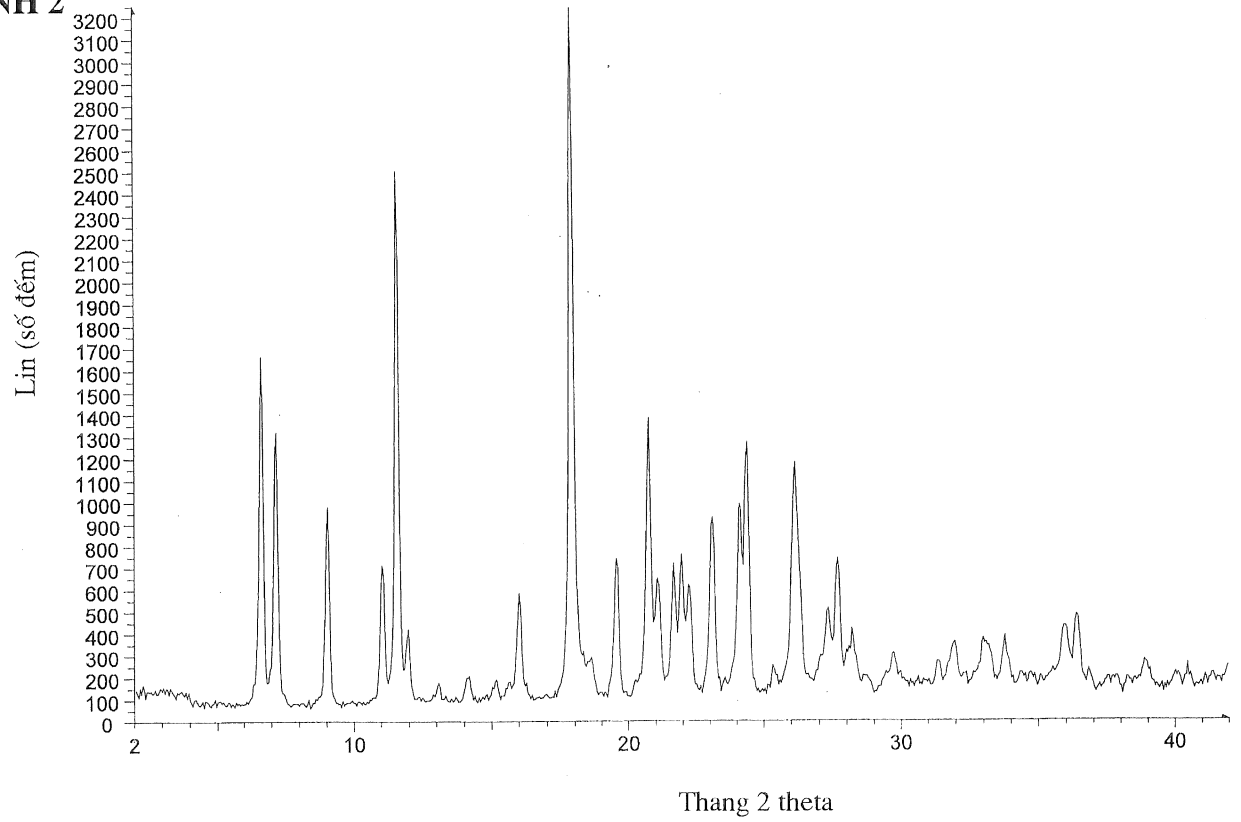
4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dược phẩm này còn chứa chất kháng virus khác.

5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó chất kháng virus khác là chất ức chế proteaza HCV NS3.
6. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó chất kháng virus khác là chất ức chế HCV NS5A.
7. Thuốc chứa (S)-isopropyl 2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)amino)propanoat ở dạng tinh thể theo các điểm 1 hoặc 2.
8. Thuốc theo điểm 7, trong đó thuốc này còn chứa chất kháng virus khác.
9. Thuốc theo điểm 8, trong đó chất kháng virus khác là chất ức chế proteaza HCV NS3.
10. Thuốc theo điểm 8, trong đó chất kháng virus khác là chất ức chế HCV NS5A.

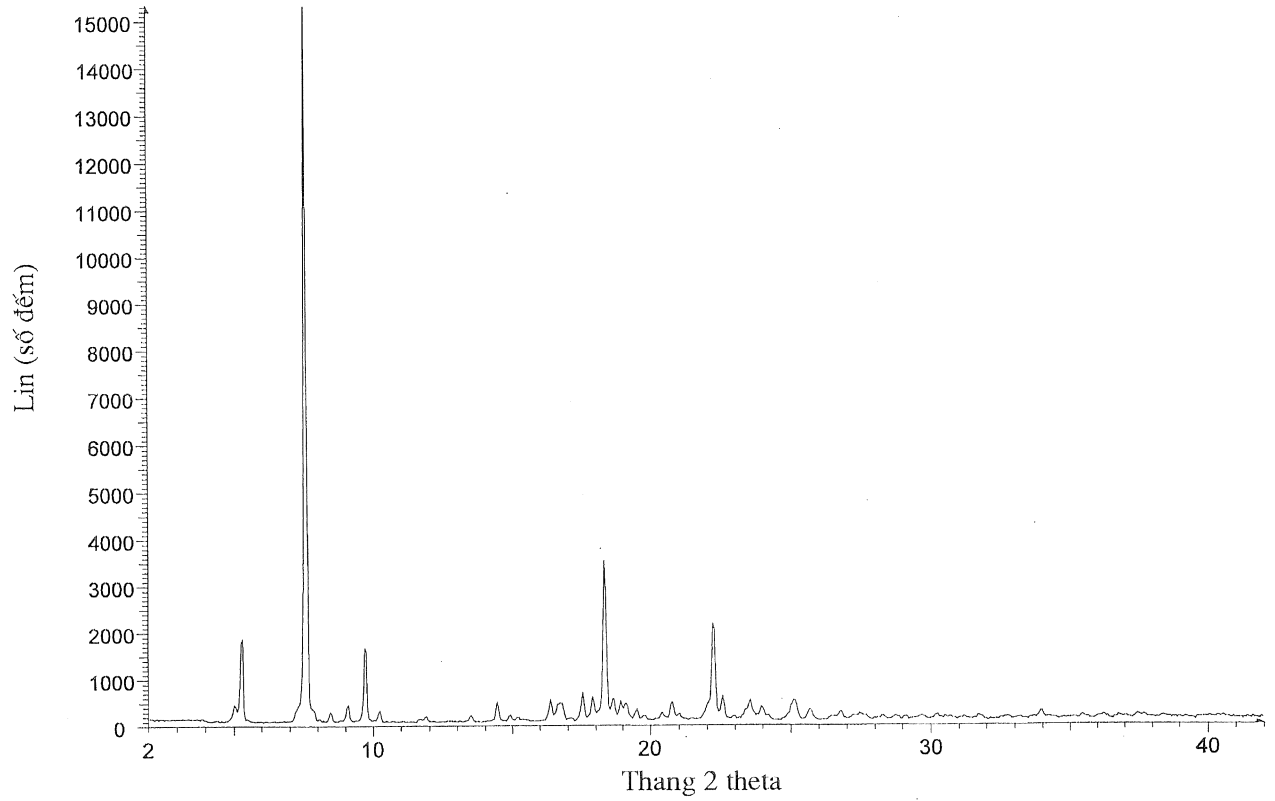
HÌNH 1



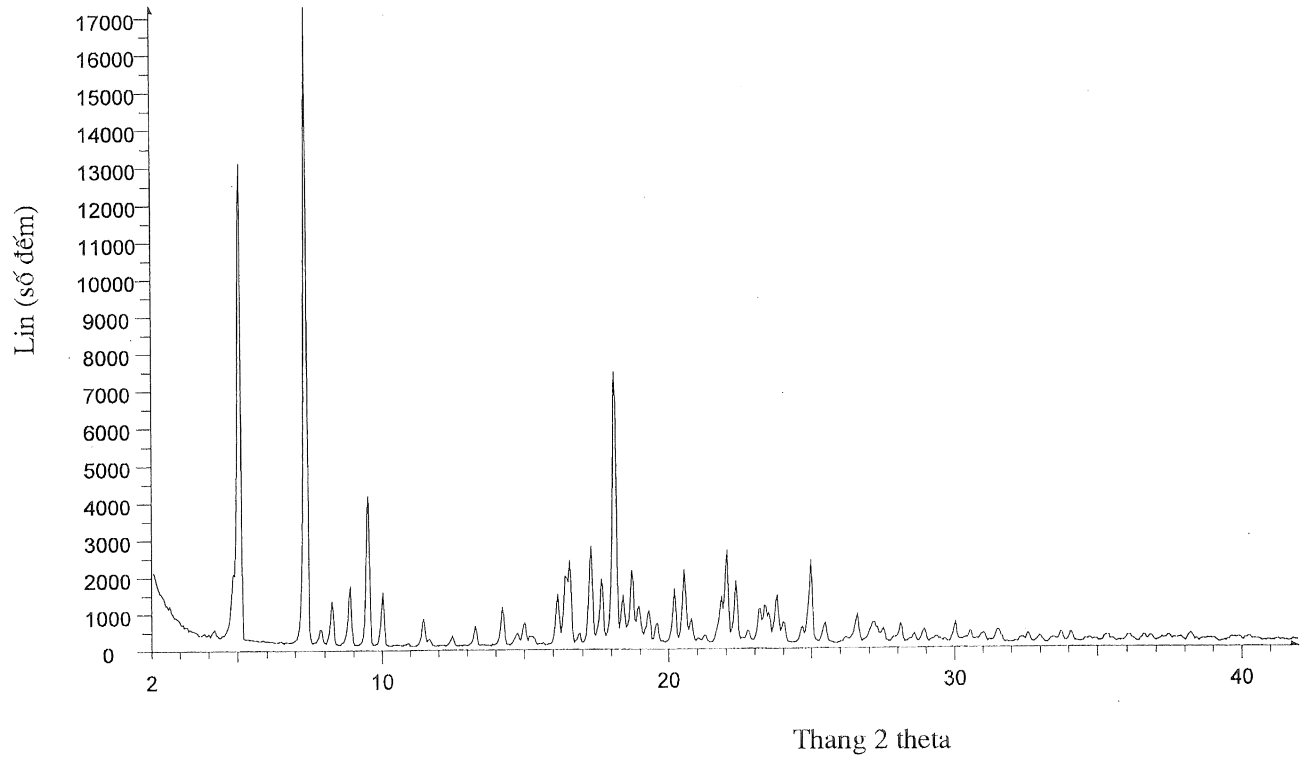
HÌNH 2



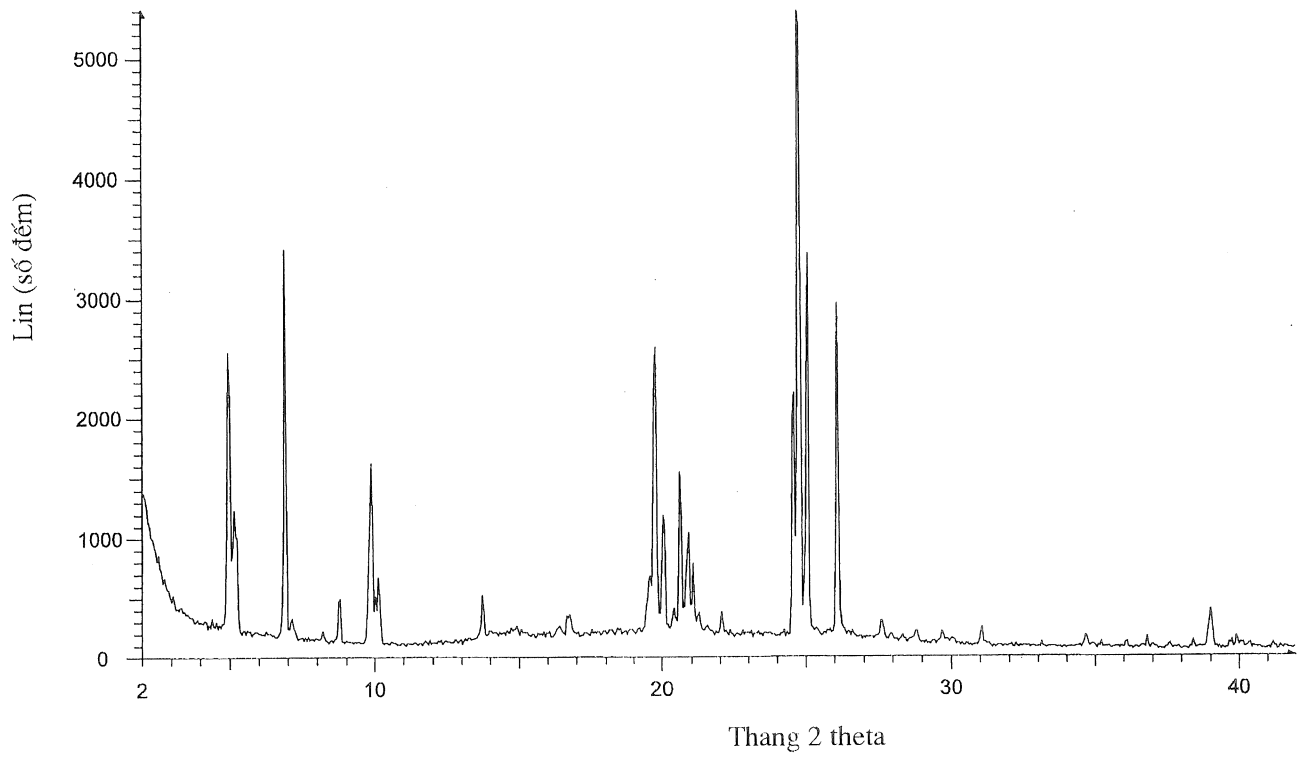
HÌNH 3



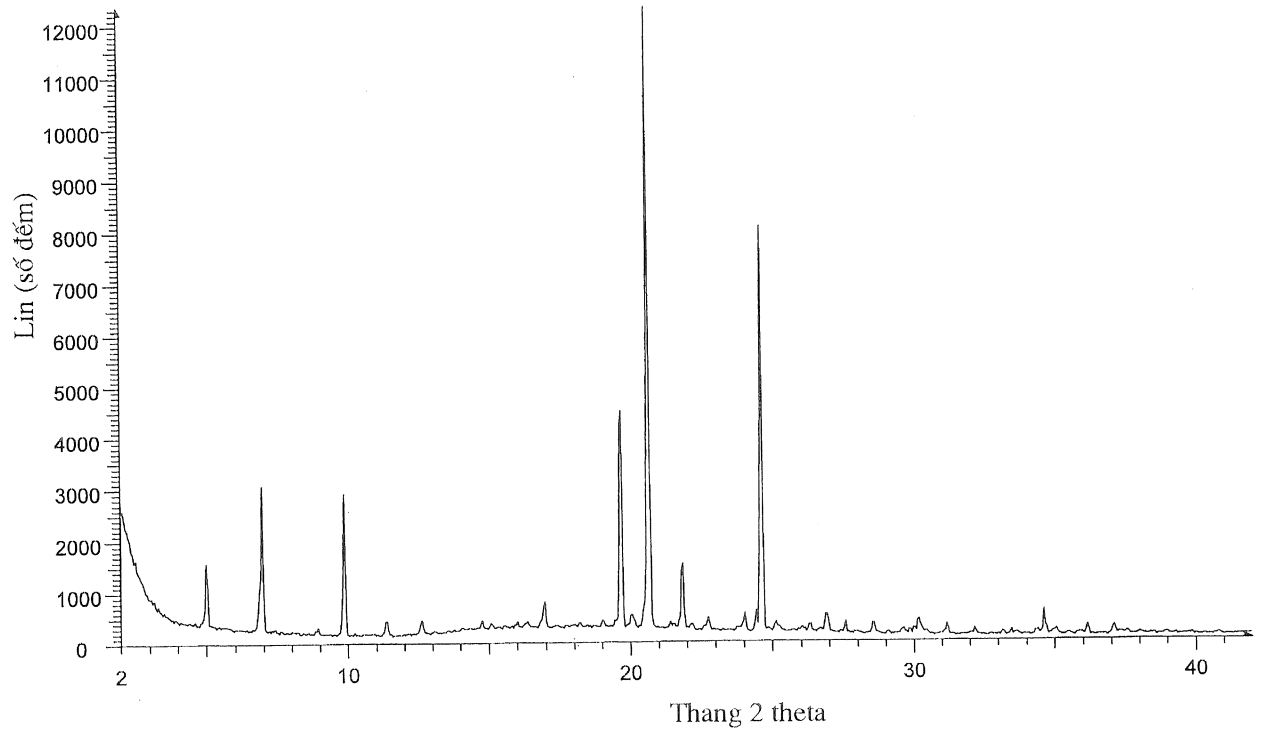
HÌNH 4



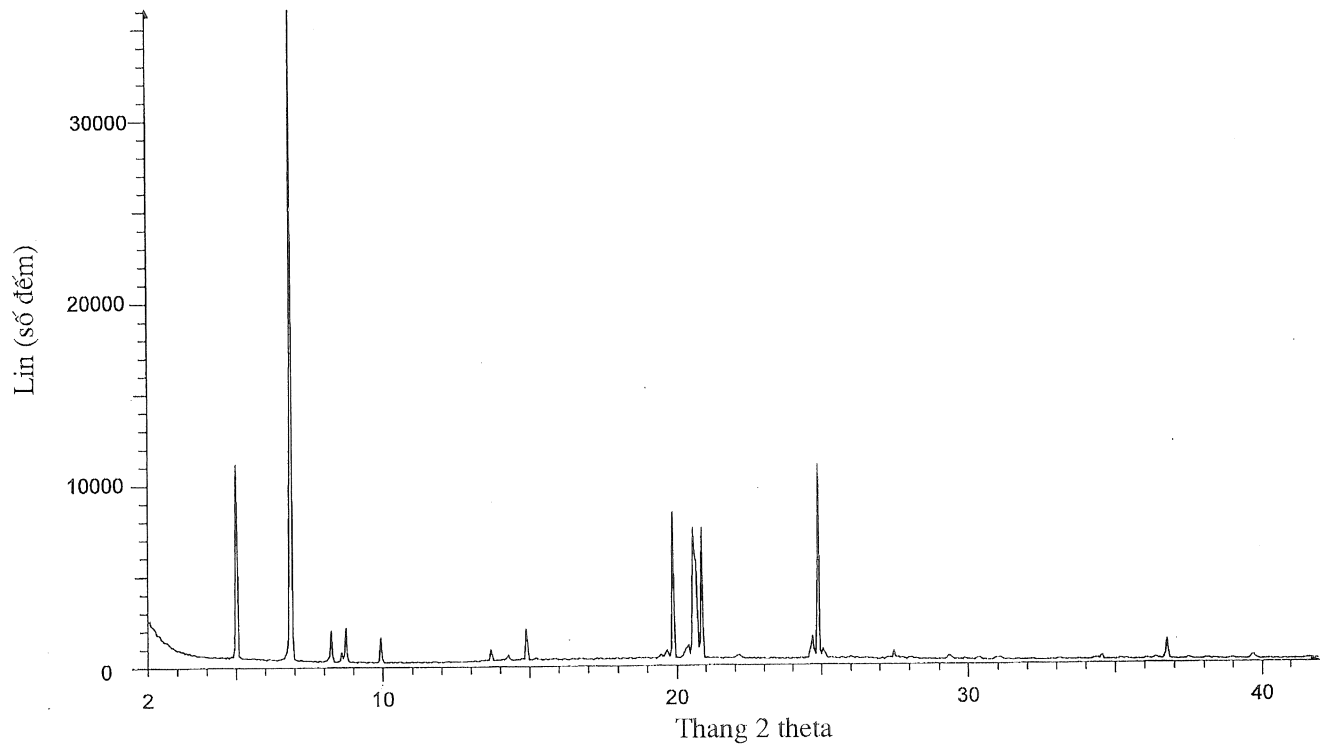
HÌNH 5



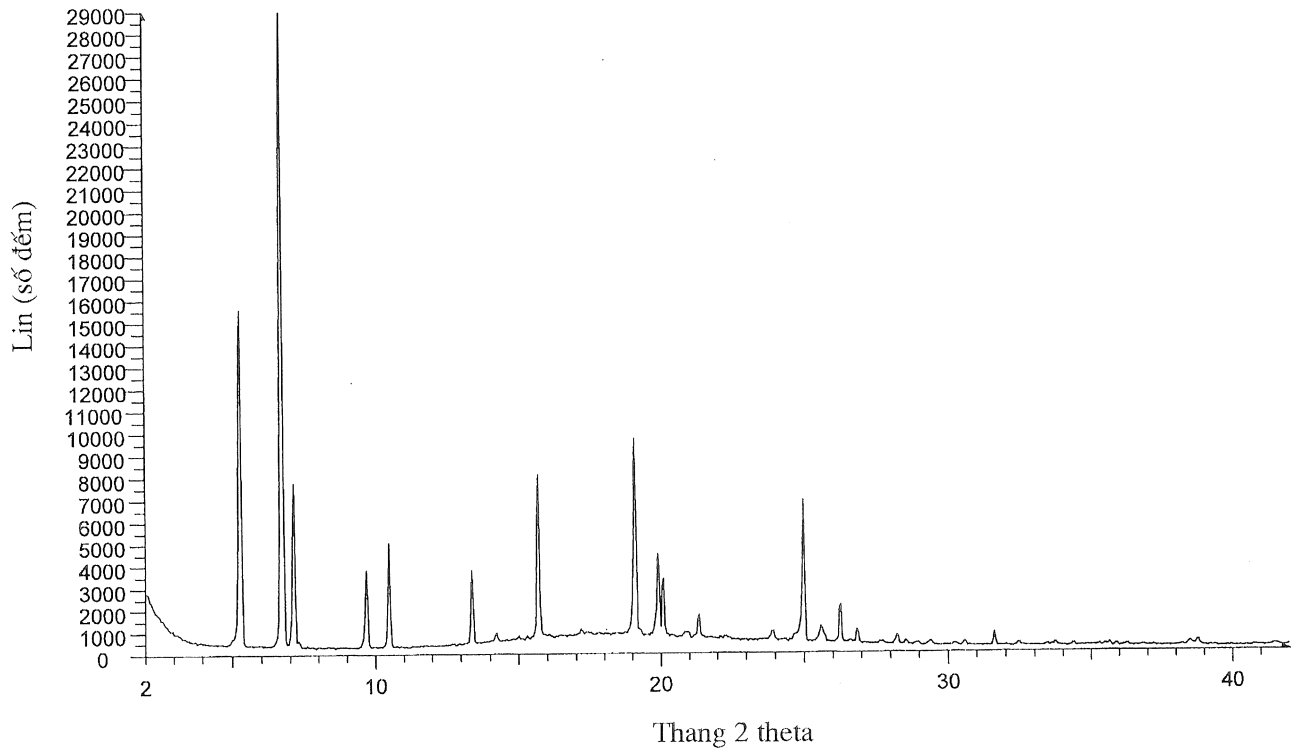
HÌNH 6



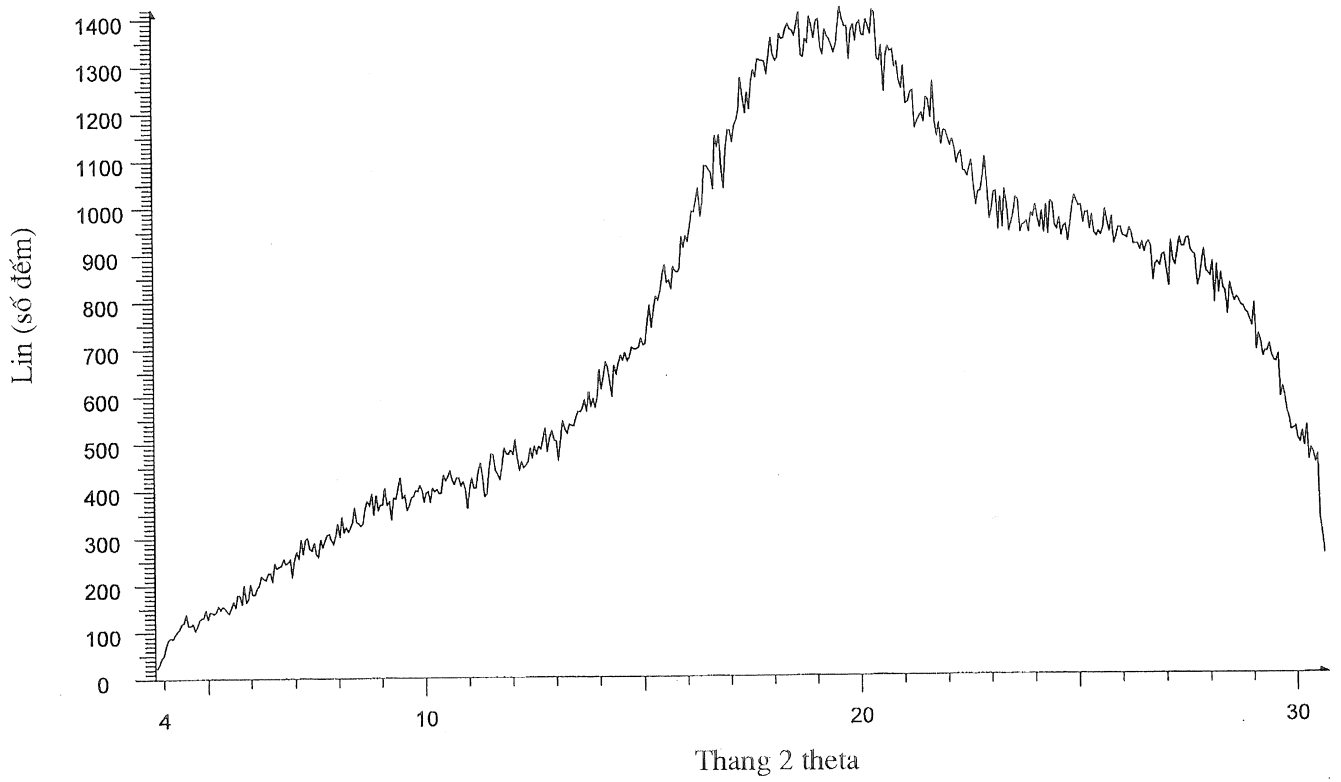
HÌNH 7



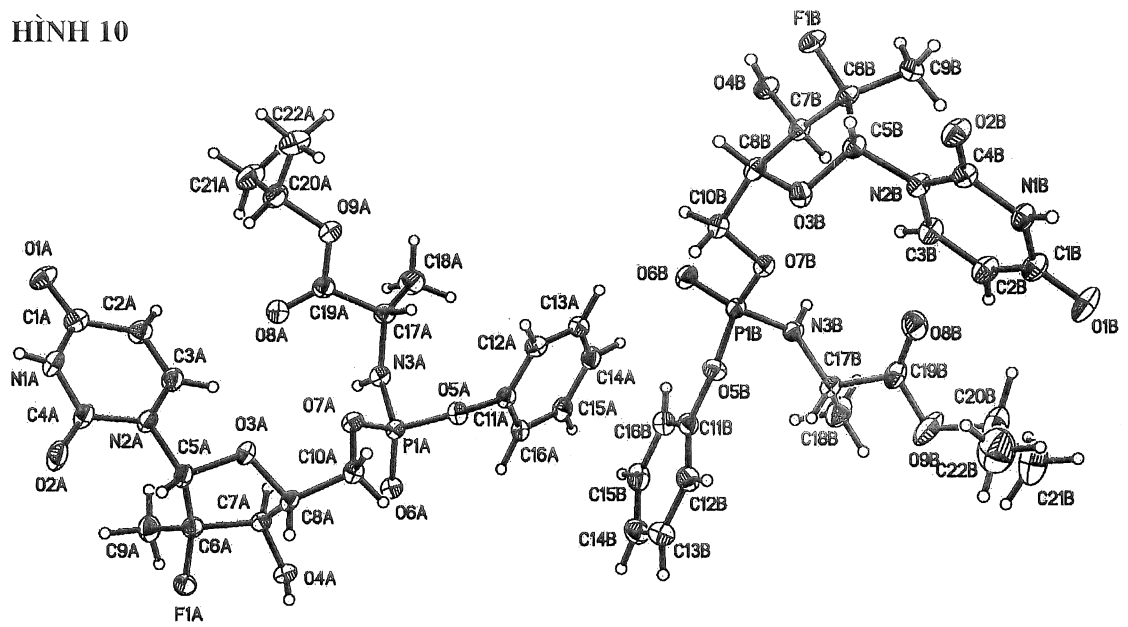
HÌNH 8



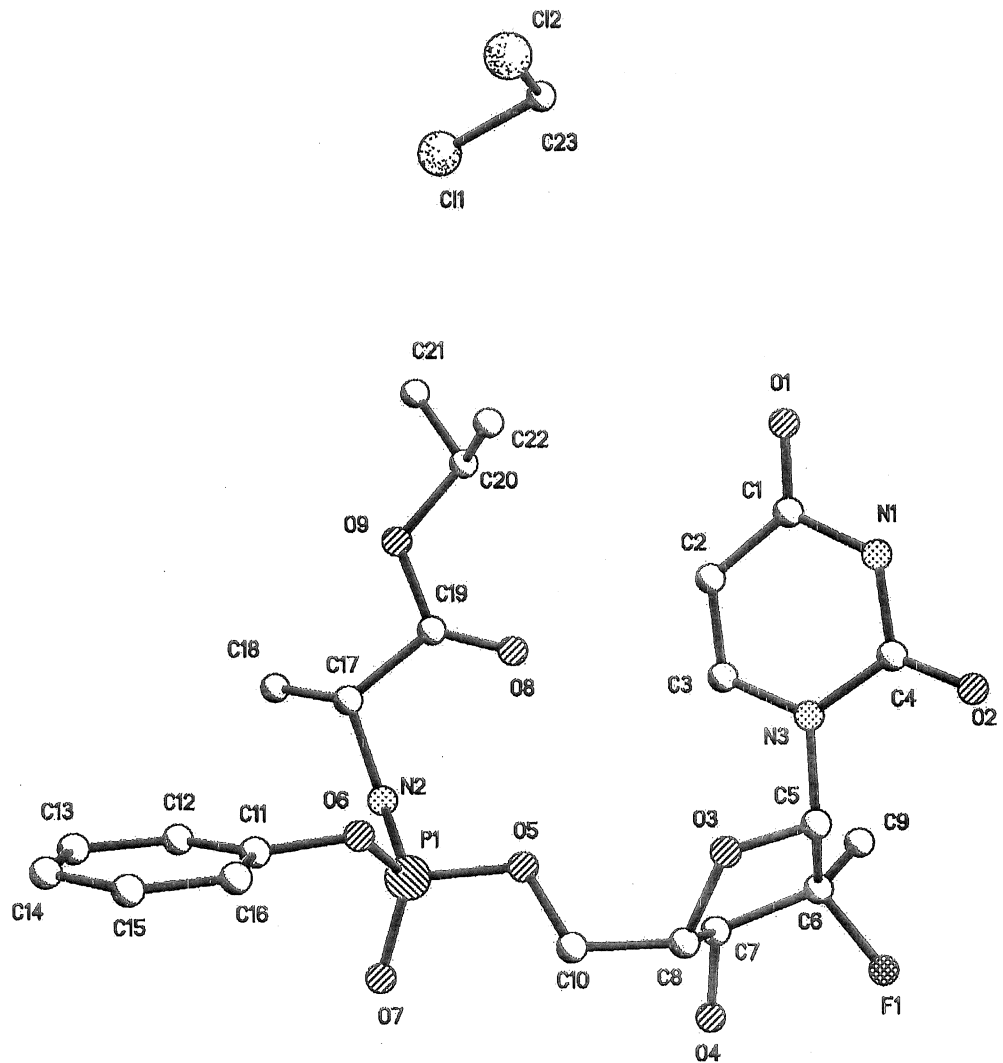
HÌNH 9



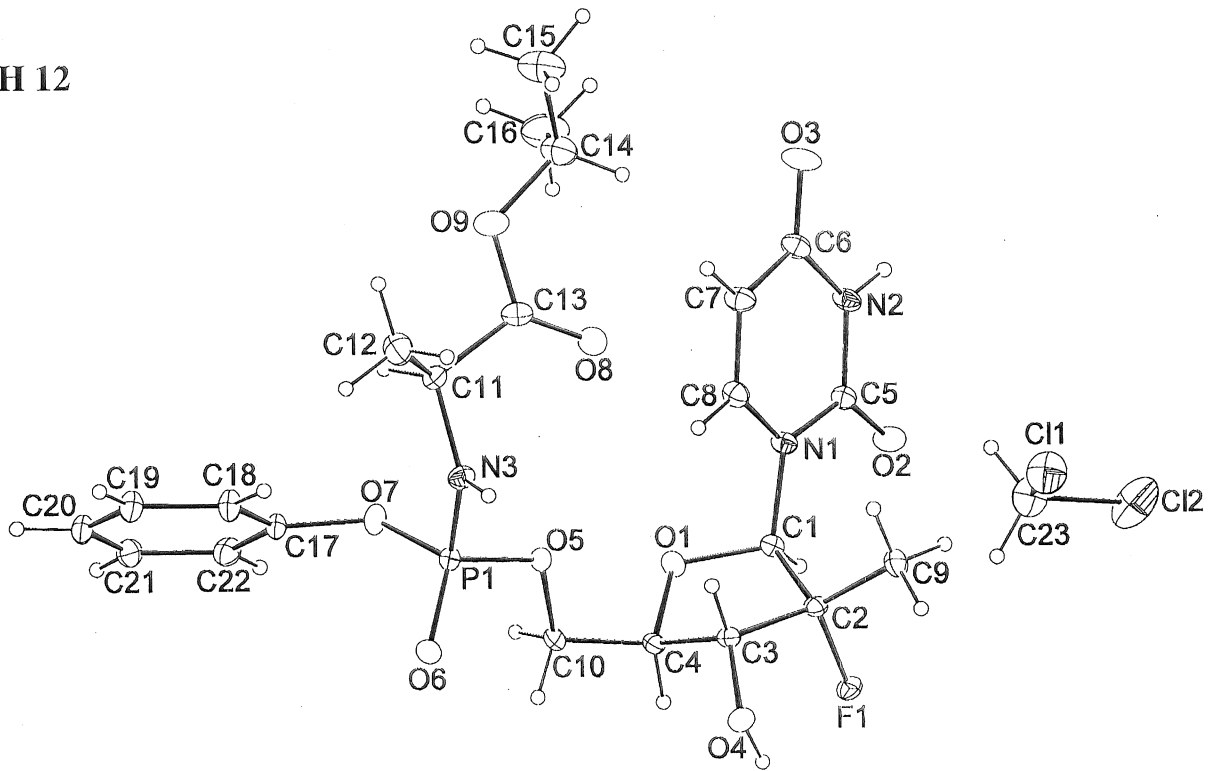
HÌNH 10



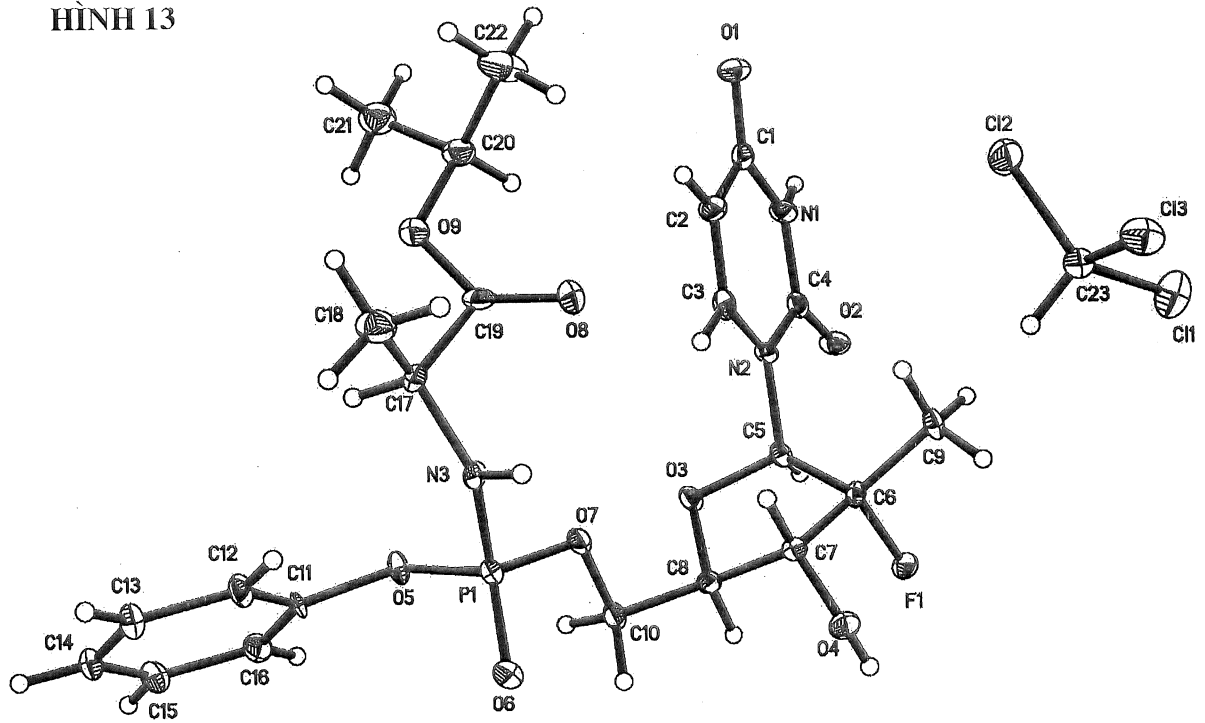
HÌNH 11



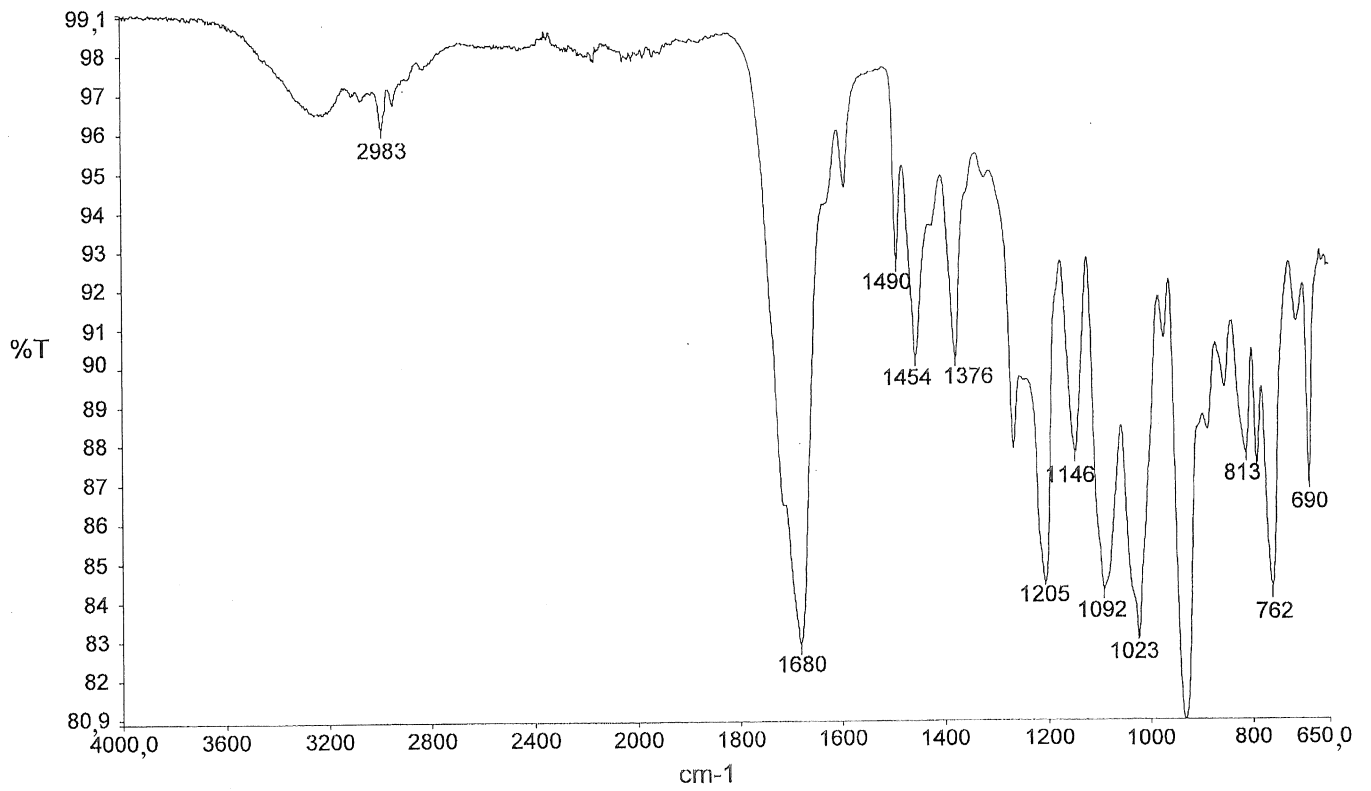
HÌNH 12



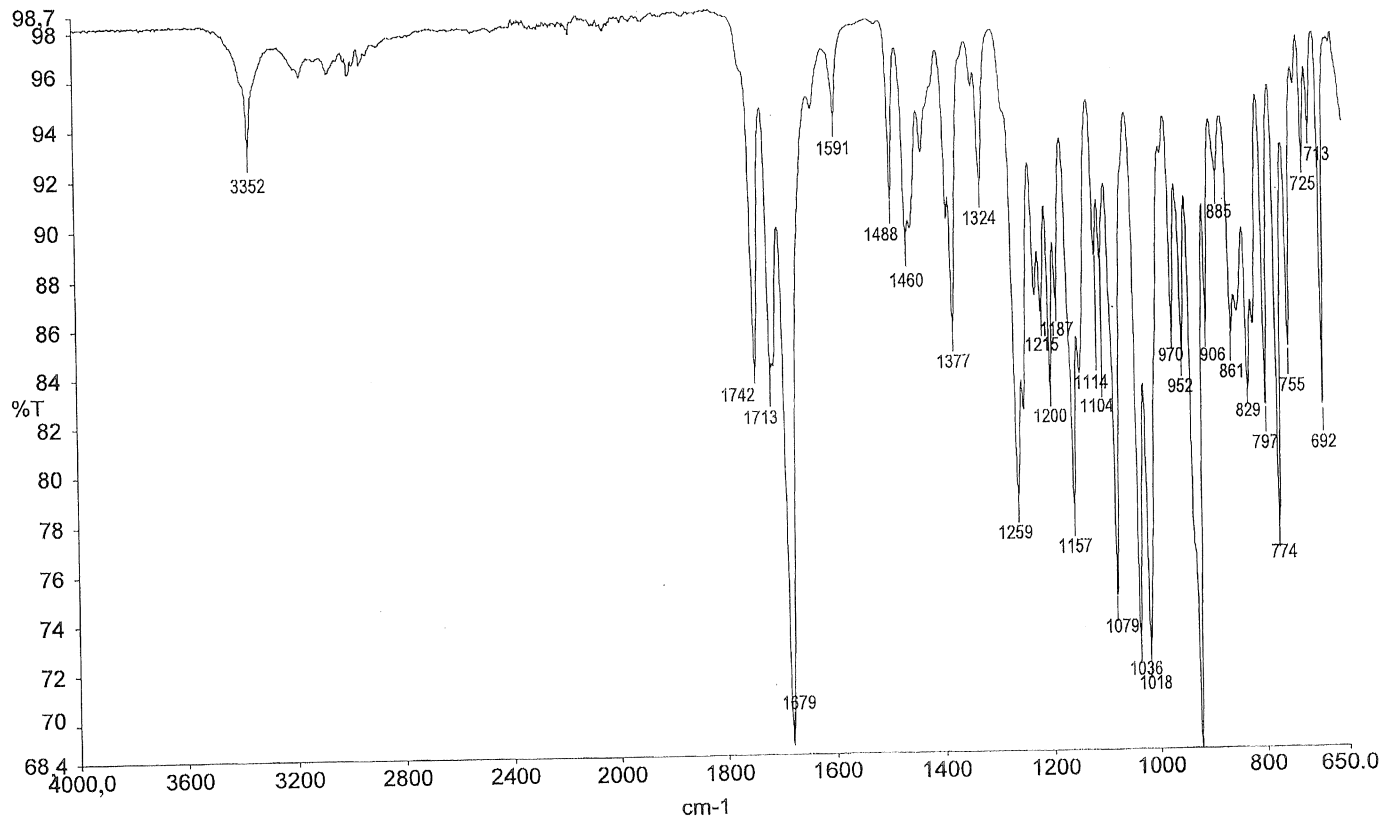
HÌNH 13



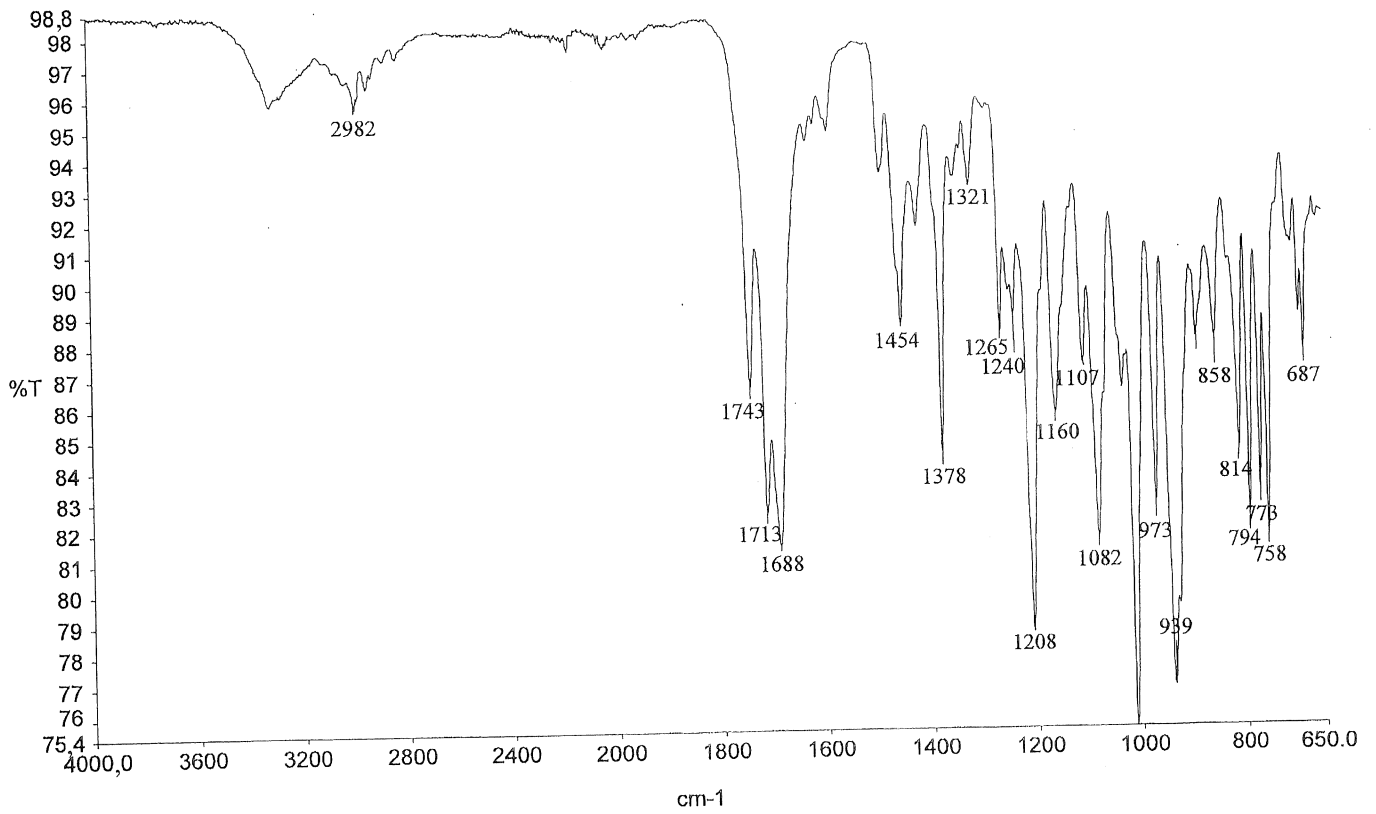
HÌNH 14



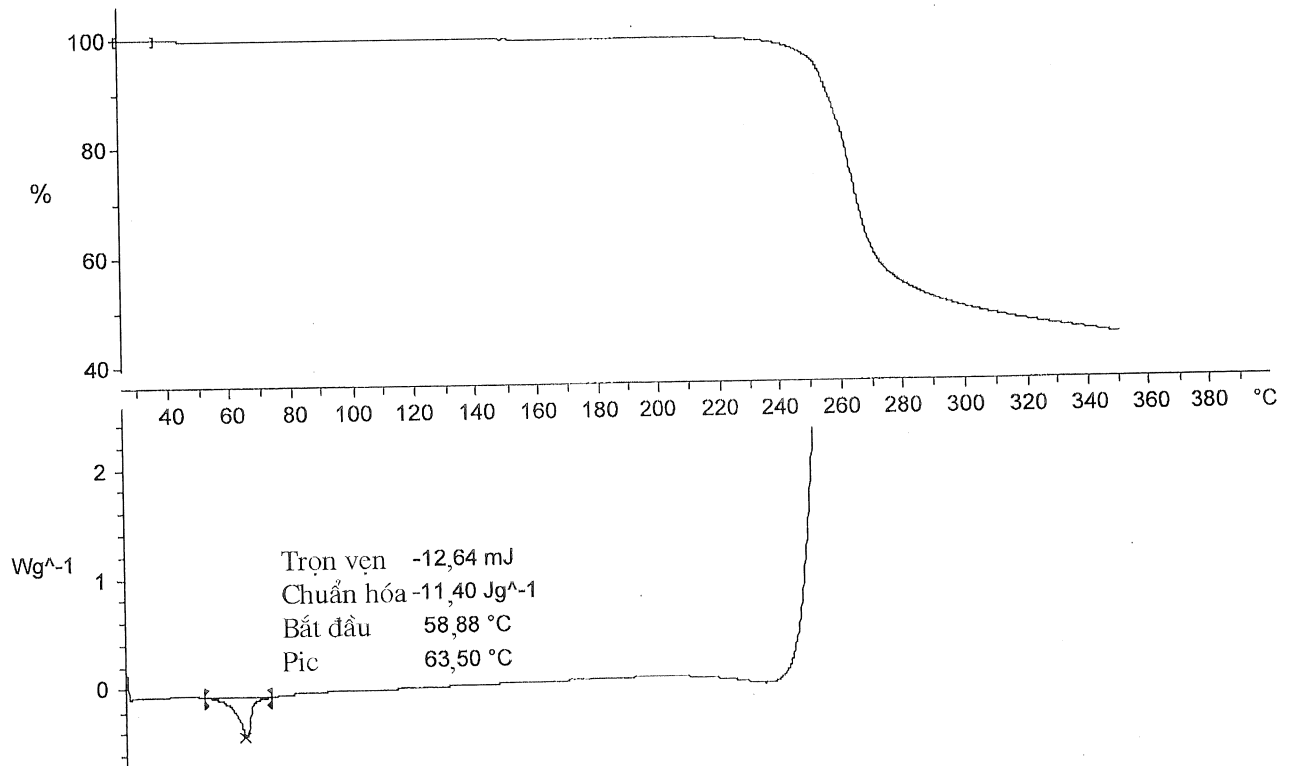
HÌNH 15



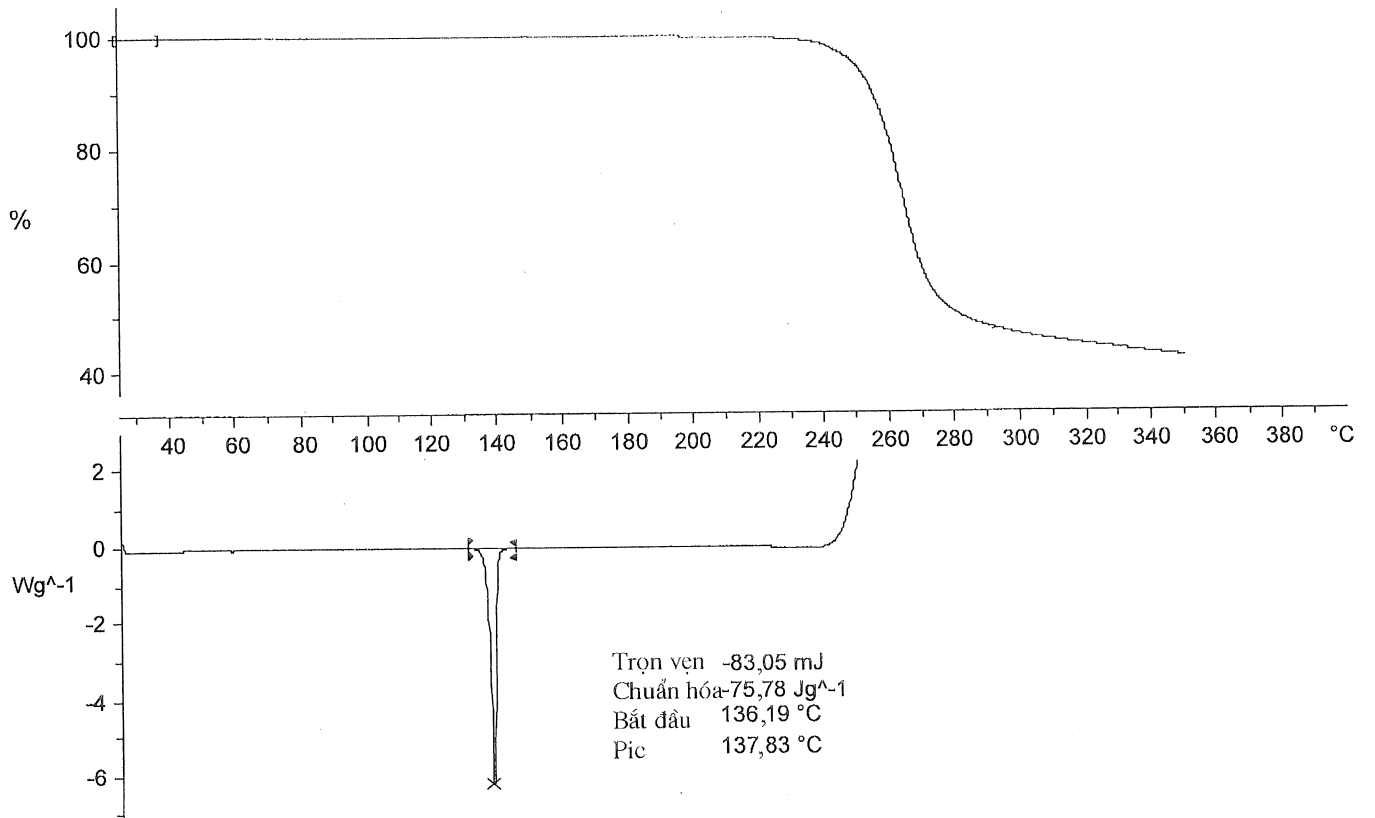
HÌNH 16



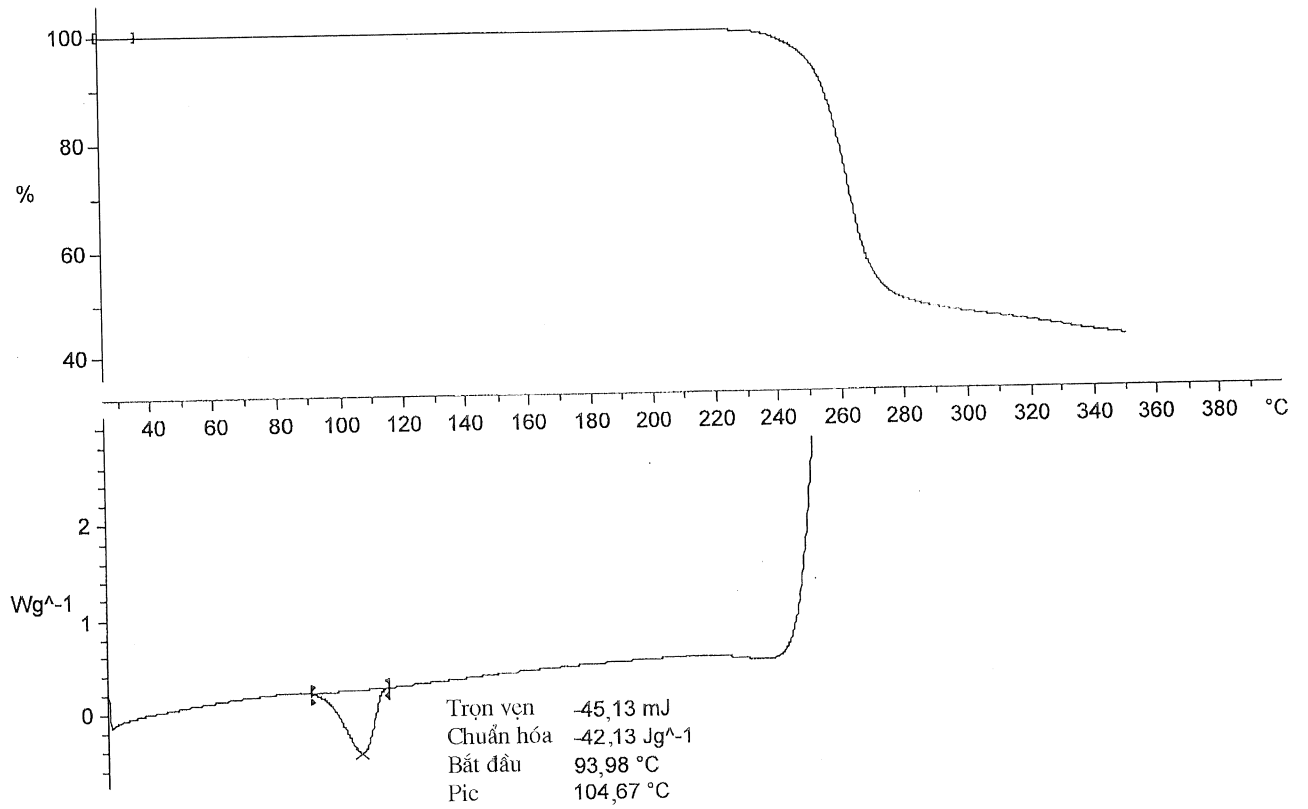
HÌNH 17



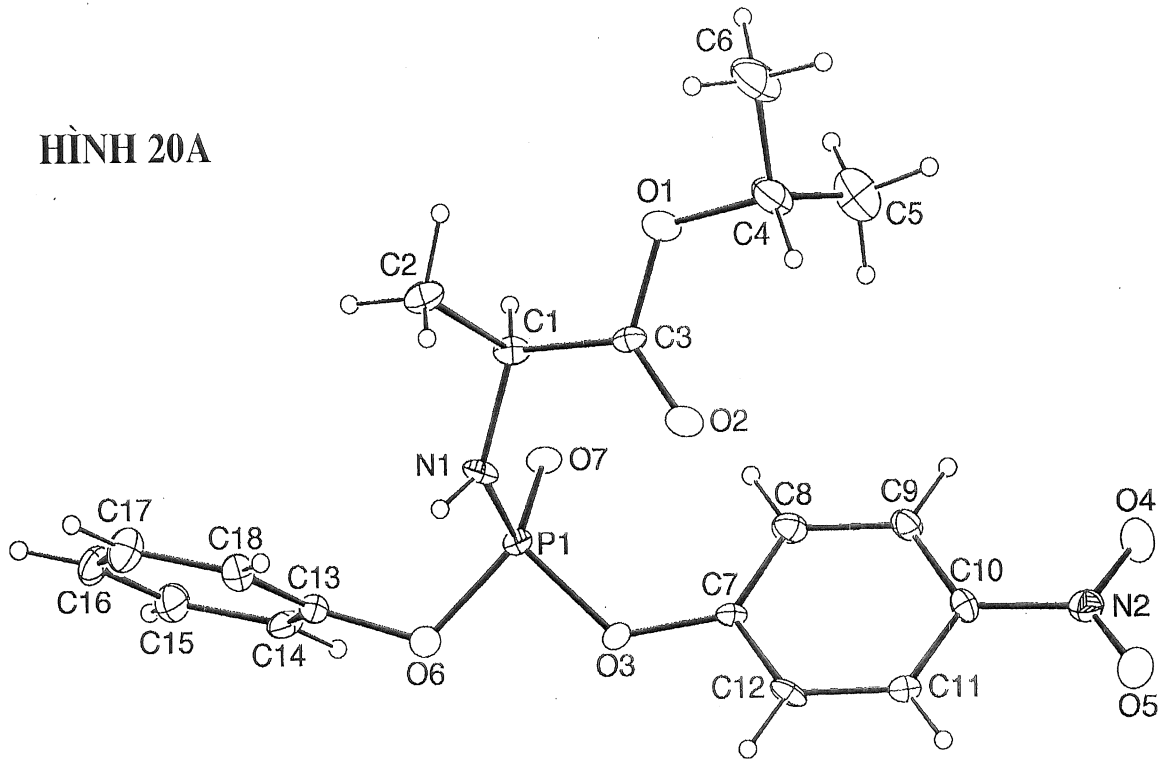
HÌNH 18



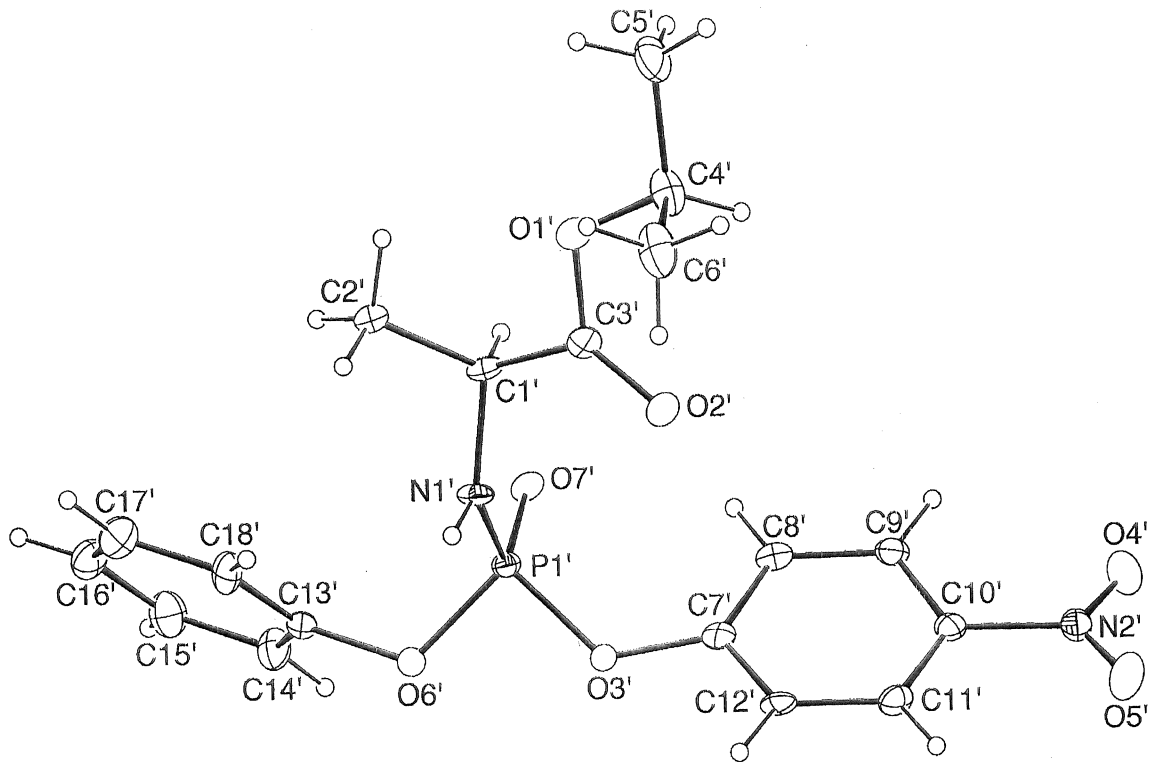
HÌNH 19



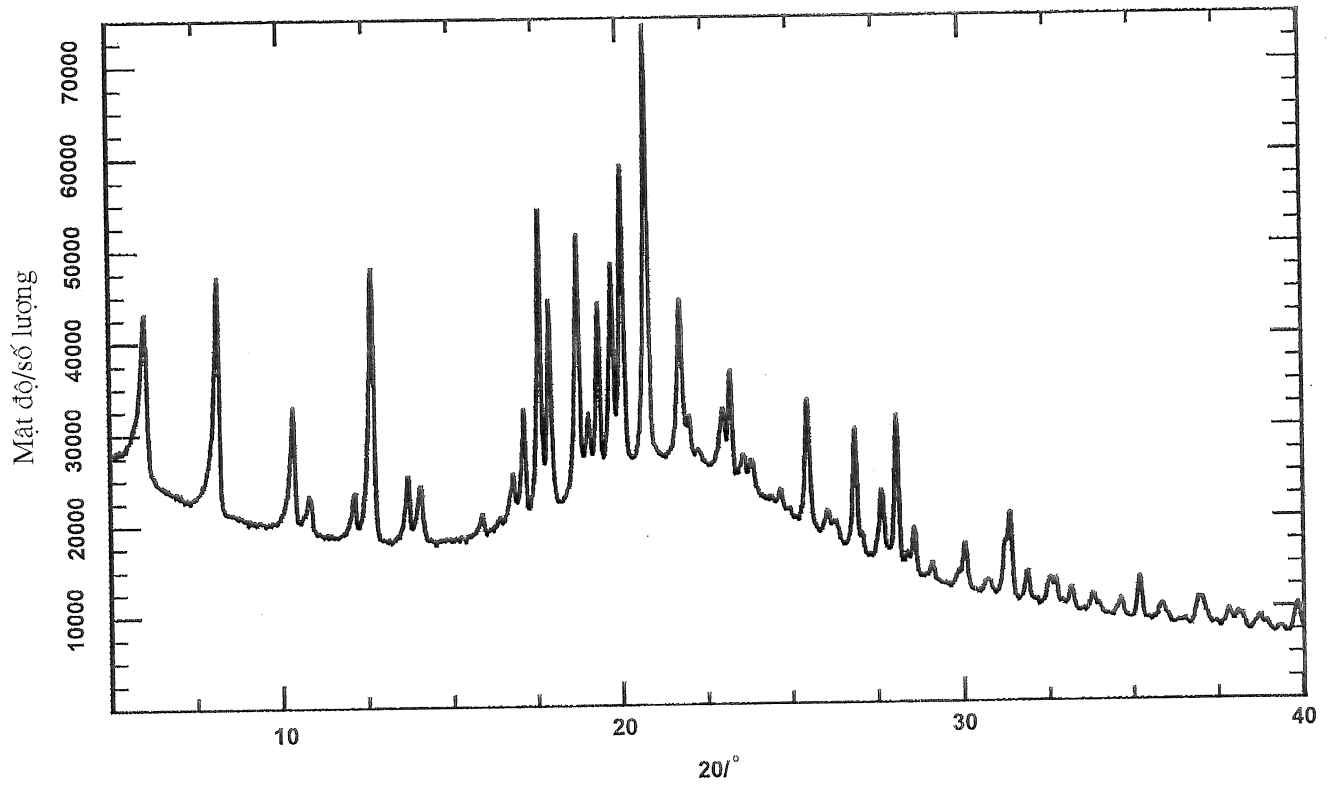
HÌNH 20A



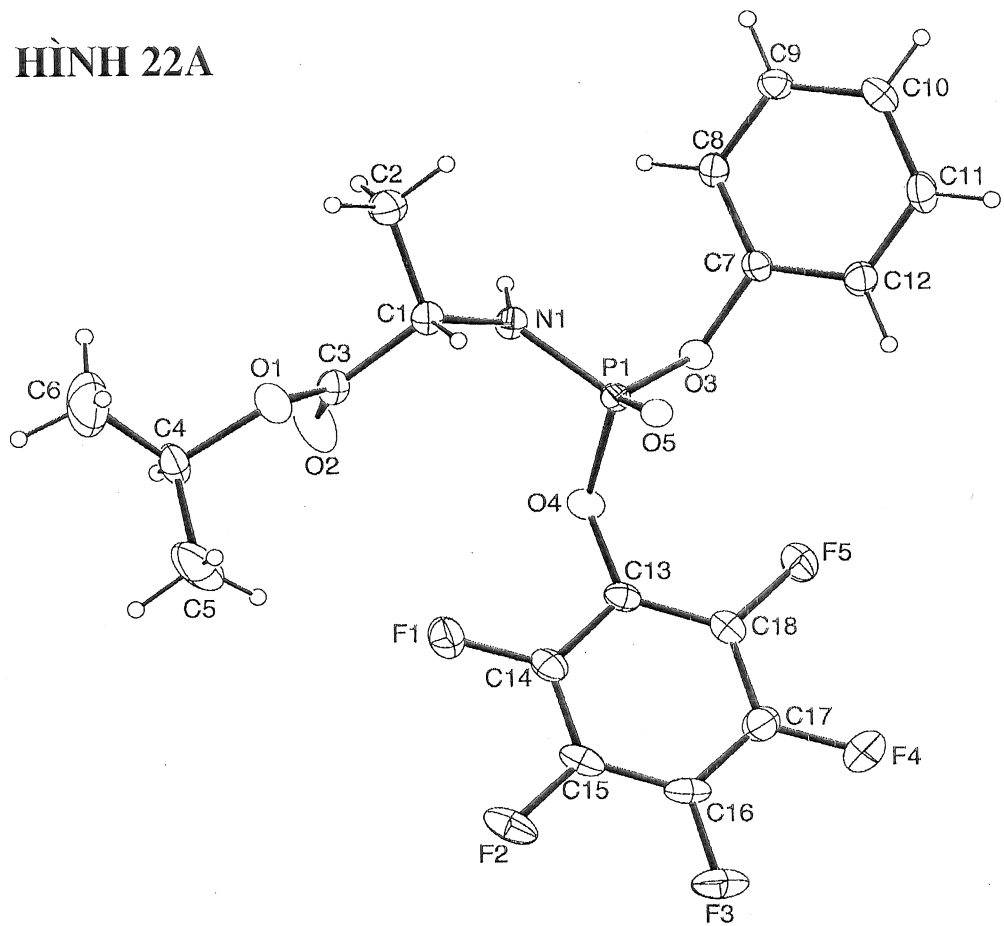
HÌNH 20B



HÌNH 21



HÌNH 22A



HÌNH 22B

