



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

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

(11)



1-0025731

(51)⁷ C07D 311/58; A61P 35/00; C07D
407/04; A61K 31/353; C07D 311/16

(13) B

(21) 1-2016-03315

(22) 05/02/2015

(86) PCT/AU2015/050040 05/02/2015

(87) WO 2015/117202 13/08/2015

(30) 61/937,368 07/02/2014 US; 61/987,323 01/05/2014 US

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/01/2017 346A

(73) NOVOGEN LIMITED (AU)

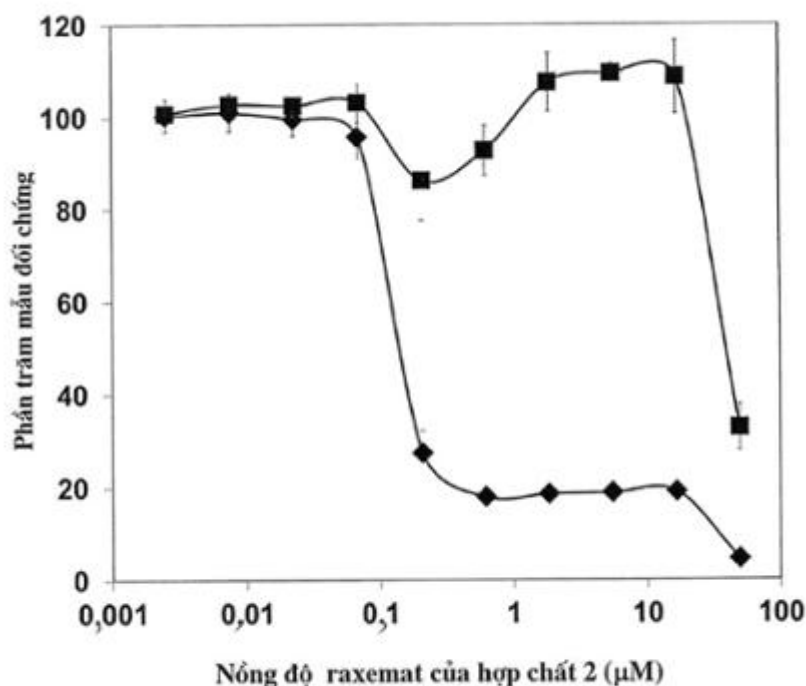
Suite 502, Level 5, 20 George Street, Hornsby, New South Wales 2077, Australia

(72) HEATON, Andrew (AU); BROWN, David (AU); KELLY, Graham (AU).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) HỢP CHẤT BENZOPYRAN ĐƯỢC CHỨC HÓA VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất chống ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất benzopyran được chọn và dược phẩm chứa hợp chất này để điều trị bệnh ung thư và làm giảm tỷ lệ hoặc nguy cơ tái phát bệnh ung thư.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập rộng rãi đến các chất chống ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất benzopyran được chọn, được phẩm chứa chúng dùng để điều trị bệnh ung thư và làm giảm tỷ lệ hoặc nguy cơ tái phát bệnh ung thư, và phương pháp điều chế hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư giết hàng nghìn người mỗi năm trên khắp thế giới. Đã có nhiều bước tiến đột phá quan trọng được tạo ra để điều trị và ngăn ngừa nhiều loại bệnh ung thư. Ví dụ, bệnh ung thư vú đã có những chương trình sàng lọc sớm cũng như nhiều kỹ thuật phẫu thuật. Tuy nhiên, các phương pháp này thường cho thấy sự suy nhược về mặt cơ thể và tinh thần. Hơn nữa, bệnh nhân đã trải qua phẫu thuật và hóa liệu pháp sau đó thường bị tái phát. Trong những năm gần đây, nghiên cứu đã chỉ ra khả năng gây ung thư không đồng nhất của các tế bào ung thư dẫn đến giả thuyết tế bào gốc ung thư (cancer stem cell-CSC). Tóm lại, giả thuyết này chỉ ra rằng chỉ một phần tế bào trong khối u có các dấu hiệu giống tế bào gốc, kể cả khả năng tăng sinh không giới hạn.

Bằng chứng khác trong tài liệu này củng cố quan niệm rằng khối u là hệ thống giống cơ quan không đồng nhất phức tạp với cấu trúc tế bào phân cấp, hơn là đơn giản là sự tập hợp của các tế bào khối u đơn đồng nhất. Tế bào u khởi đầu vẫn có khả năng tạo ra thế hệ con khác nhau ở các mức biệt hóa khác nhau, từ các tế bào gốc đa năng không ràng buộc, đến các tế bào tổ tiên ràng buộc, đến các tế bào thể hệ sau lão hóa được biệt hóa hoàn toàn. Theo cách này, chính quần thể tế bào khối u là không đồng nhất, bổ sung cấu trúc gồm nhiều loại khác nhau được tạo ra bởi các tế bào miễn dịch, tế bào sinh dưỡng, và tế bào mạch máu mà cũng có mặt ở các khối u. Một số tế bào trong “cơ quan ung thư” hoặc khối u này có tiềm năng tăng sinh liên tục. Do đó, sự phát sinh loài của các khối u này đề xuất sự tồn tại của quần thể tế bào mà vẫn có khả năng tự làm mới lại trong khi cũng thường có khả năng tạo ra thế hệ con có thể biệt hóa. Do đó, tế bào gốc ung thư được xác định là tế

bào trong khối u có khả năng tự làm mới lại và tạo ra các dòng tế bào ung thư không đồng nhất của gồm khối u. Thực vậy, bằng chứng phòng thí nghiệm xác nhận rằng việc tiêm các tế bào giống tế bào gốc ung thư buồng trứng, ung thư não, ung thư ruột kết, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt hoặc ung thư tuyến tụy đã phân lập vào chuột bị suy giảm miễn dịch dẫn đến tạo thành các khối u mà giống về kiểu hình với khối u ban đầu và chứa cả tế bào giống tế bào gốc và tế bào không giống tế bào gốc.

Do đó, có hai quần thể riêng biệt; một tập hợp con được biệt hóa tương đối nhiều với khả năng tăng sinh giới hạn tạo ra khối u đặc trưng về kiểu hình cho bệnh, và tập hợp con thứ hai nhỏ hơn, được biệt hóa ít hơn chứa CSC tạo dòng. Quan trọng là, CSC thể hiện kháng nhiều dược chất, một đặc tính khác mà góp phần vào tuổi thọ của chúng và tiềm năng di căn bởi sự cho phép chúng sống sót sau khi nhiễm độc tố, bao gồm nhiều dược chất hiện được sử dụng để điều trị bệnh ung thư. Do đó, có nhu cầu phát triển các liệu pháp mà nhắm đích cụ thể vào khả năng tự làm mới lại của quần thể tế bào gốc, do đó phá hủy nguồn tái phát khối u là kết quả của sự đề kháng với các liệu pháp thông thường.

Chất đánh dấu CSC giả định đã được mô tả đối với các bệnh ác tính, bao gồm bệnh bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính (CD34-dương tính/CD38-âm tính), vú (CD44-dương tính/CD24-âm tính/-thấp/âm tính với Lin), tuyến tiền liệt (CD44-dương tính/_2_1-ca/CD133-dương tính) và não (CD133-dương/dương tính với nestin), đã phản ánh các chất được biểu hiện bởi tình trạng ban đầu của các bản sao mô bình thường của chúng. Bằng chứng gần đây chứng minh rằng các tế bào ung thư buồng trứng CD44+ cũng có khả năng tạo ra các khối u ở chuột bị suy giảm miễn dịch. Như với các kiểu hình CSC khác, tế bào gốc ung thư buồng trứng phát triển chậm, kháng hóa chất và tạo ra các khối u ở chuột bị suy giảm miễn dịch giống nhau về kiểu hình với khối u ban đầu ở chỗ có chủ yếu là các tế bào CD44+ve tạo ra khối u với các ổ nhỏ các tế bào CD44+ve.

Nhiều bệnh ung thư tiến triển tái phát mặc dù sử dụng liệu pháp hóa học và phóng xạ mà ban đầu có đáp ứng điều trị. Ví dụ, chiếu xạ u nguyên bào đệm có thể dẫn tới đáp ứng đáng kể với chiếu xạ tia X, tuy nhiên các khối u này vẫn luôn tái

phát và làm cho bệnh nhân tử vong. Thường xuyên, u nguyên bào đệm tái phát ở dạng hạt, gợi ý có nguồn dòng đơn tính hoặc đa tính của tế bào khối u tái phát mà có thể chịu được các liệu pháp gây độc hại tế bào thông thường, bao gồm liệu pháp chiếu xạ, dẫn đến tái phát bệnh. Ngoài ra, các khối u tái phát còn chứng minh tính không đồng nhất trong quần thể tế bào khối u liên quan đến sự có mặt của cả CSC và tế bào không phải là tế bào gốc ung thư-không phải CSC cũng như trong sự khác biệt về mô học và di truyền học tế bào. Điều này đề xuất rằng CSC mà cư trú ở khối u ban đầu có thể chịu được sự can thiệp bằng điều trị để phục hồi quần thể khối u tái phát ngay cả sau khi khối u đã được loại bỏ bằng cách cắt bỏ hoặc liệu pháp xạ hóa trị, dẫn đến khái niệm mà CSC là nguồn tái phát khối u sau điều trị. Sự thay đổi về chiến lược điều trị dẫn đến sự phát triển tác nhân nhắm đích duy nhất là tấn công CSC có thể làm tăng khả năng chữa bệnh ung thư và kéo dài sự sống sót của nhiều bệnh nhân.

Đáng ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc chọn các hợp chất benzopyran có thể đem lại hiệu quả sinh học lớn lao đối với tế bào không phải là tế bào gốc ung thư-không phải CSC cũng như CSC. Các hợp chất này đem lại chiến lược điều trị khác để điều trị bệnh ung thư và làm giảm tỷ lệ hoặc nguy cơ tái phát bệnh ung thư.

WO2012/061409 bộc lộ được phẩm chứa ít nhất một isoflavonoit và phương pháp điều trị bệnh ung thư, làm cho tế bào ung thư nhạy cảm, và bao gồm làm chết tế bào theo chương trình các tế bào ung thư bằng cách dùng các chế phẩm này.

US2012/251630 bộc lộ phương pháp làm giảm tỷ lệ tái phát bệnh ung thư. Phương pháp bao gồm dùng isoflavonoit để làm thuyên giảm bệnh cho cá thể bị mắc ung thư. Trong các trường hợp cụ thể, cá thể được điều trị thuyên giảm mắc bệnh ung thư biểu mô, như ung thư buồng trứng hoặc ung thư vú.

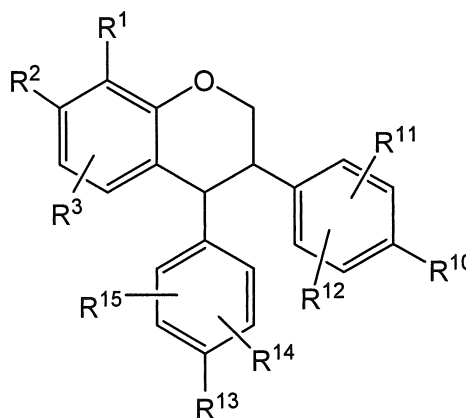
WO2005/049008 bộc lộ các liệu pháp kết hợp bao gồm liệu pháp xạ trị hoặc liệu pháp hóa trị để điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh liên quan.

WO2006/032086 bộc lộ các dẫn xuất chroman và các hợp chất trung gian, các chế phẩm chứa hợp chất này, các phương pháp điều chế và việc sử dụng chúng làm dược chất, cụ thể là các chất hóa trị liệu và chống ung thư chọn lọc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất thích hợp để điều trị bệnh ung thư và làm giảm tỷ lệ mắc bệnh ung thư hoặc giảm nguy cơ tái phát bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức chung (I):



(I)

hoặc muối, hydrat, dẫn xuất, hoặc solvat dược dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_6 alkyl,

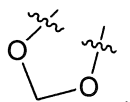
R^2 được chọn từ nhóm bao gồm: OH và C_1 - C_6 alkoxy,

R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_6 alkyl và halo,

R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OH, C_1 - C_6 alkoxy, NH_2 , $NHMe$, $NHEt$, $N(Me)_2$ và $N(Et)_2$,

R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, OH, C_1 - C_6 alkyl và halo, hoặc

R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} cùng nhau tạo thành cấu trúc sau:



R^{10} là OH, và

R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, C_1 - C_4 alkyl và F.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất cùng với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất.

Phương pháp này có thể còn bao gồm việc dùng tác nhân hóa trị liệu khác.

Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư đã tái phát.

Bệnh ung thư có thể là đề kháng với một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu.

Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư kết trực tràng, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não (bao gồm trẻ em và người lớn), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tử cung, u nguyên bào thần kinh, u trung biểu mô, bệnh cổ tử cung ác tính hoặc bệnh ung thư phúc mạc.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất để sử dụng trong phương pháp điều trị, trong đó điều trị là làm giảm tỷ lệ, hoặc nguy cơ tái phát bệnh ung thư ở đối tượng được cho là có nguy cơ tái phát bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất

Đối tượng này có thể là đối tượng có thuyên giảm bệnh ung thư. Đối tượng này có thể là có thuyên giảm bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư não hoặc một số bệnh ung thư khác như một hoặc nhiều bệnh ung thư nêu trên.

Sáng chế mô tả phương pháp gây ra sự chết tế bào theo chương trình trong, hoặc ức chế quá trình tăng sinh tế bào gốc ung thư, phương pháp này bao gồm việc cho tế bào gốc ung thư tiếp xúc với lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất.

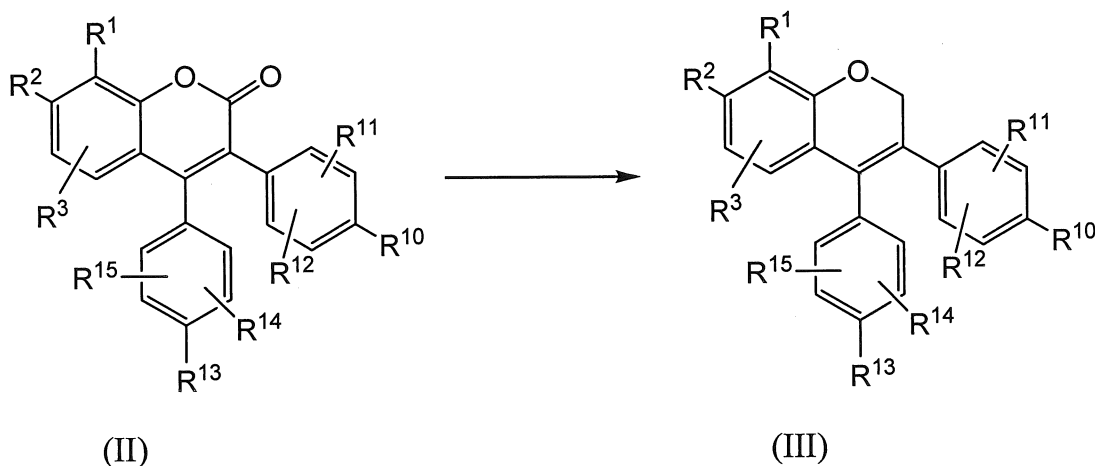
Tế bào gốc ung thư có thể là tế bào gốc ung thư buồng trứng hoặc tế bào gốc ung thư não.

Theo khía cạnh nữa, sáng chế mô tả hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh ở đối tượng do tế bào gốc ung thư gây ra, phương pháp này bao gồm sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hợp chất có công thức (I) theo khía cạnh thứ nhất.

Bệnh này có thể là bệnh ung thư. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư di căn. Tế bào gốc ung thư có thể là tế bào gốc ung thư buồng trứng hoặc tế bào gốc ung thư não.

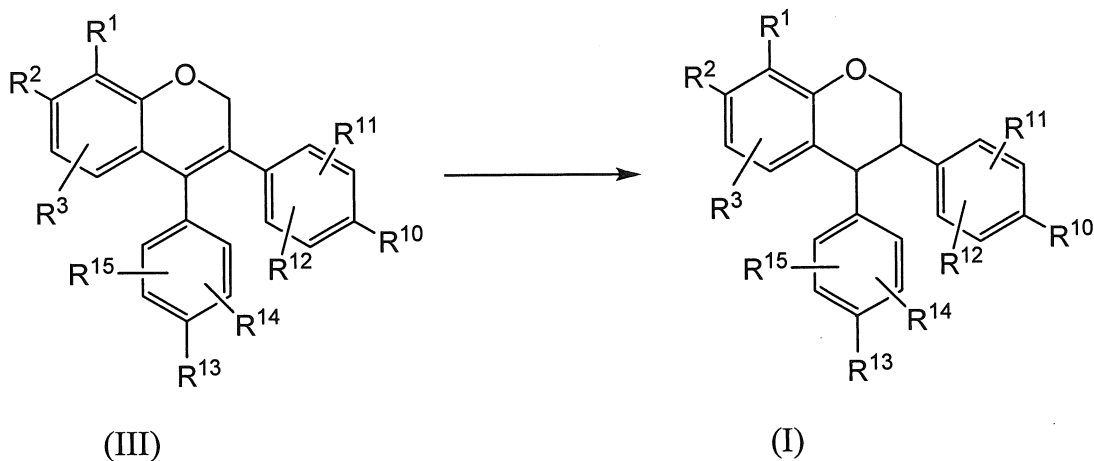
Sáng chế mô tả phương pháp điều chế hợp chất có công thức (I) bao gồm các bước:

(a) khử hợp chất có công thức (II) để tạo ra hợp chất có công thức (III):



trong đó trong hợp chất có công thức (II) R^1 , R^3 , và R^{10} đến R^{15} là như được xác định trong khía cạnh thứ nhất, và R^2 là OAc hoặc như được xác định trong khía cạnh thứ nhất, và trong hợp chất có công thức (III) R^1 đến R^3 và R^{10} đến R^{15} là như được xác định trong khía cạnh thứ nhất, và

(b) hydro hóa hợp chất có công thức (III) để tạo ra hợp chất có công thức (I),



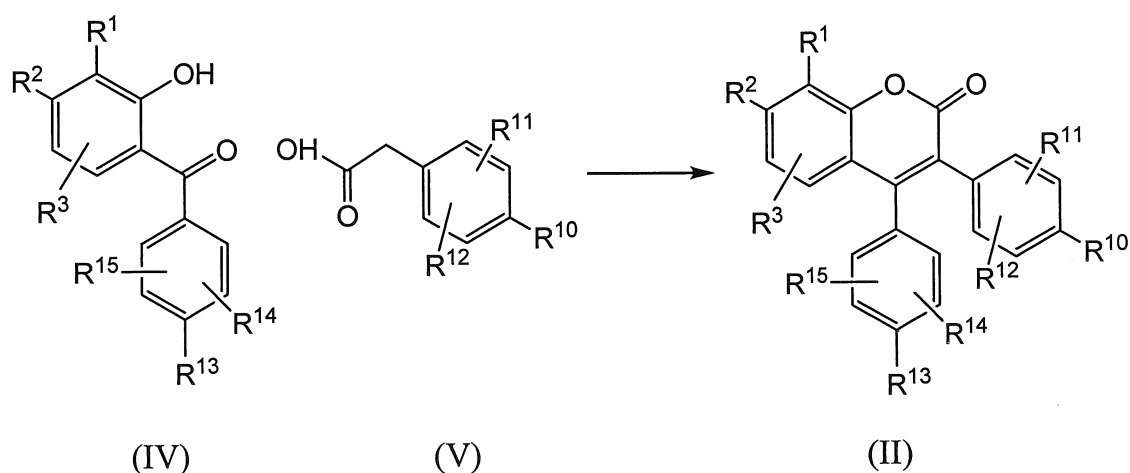
trong đó R^1 đến R^3 , và R^{10} đến R^{15} là như được xác định trong khía cạnh thứ nhất.

Bước (a) có thể được thực hiện bằng cách cho hợp chất có công thức (II) phản ứng với chất phản ứng boran, ví dụ, phức boran dimetylsulfua, decboran, 9-BBN hoặc phức boran tetrahydrofuran.

Bước (b) có thể được thực hiện bằng cách cho hợp chất có công thức (III) phản ứng với chất xúc tác kim loại không đồng nhất trong môi trường khí hydro.

Theo một phương án, phương pháp này còn có thể bao gồm bước:

(c) cho hợp chất có công thức (IV) phản ứng với hợp chất có công thức (V) để tạo ra hợp chất có công thức (II)



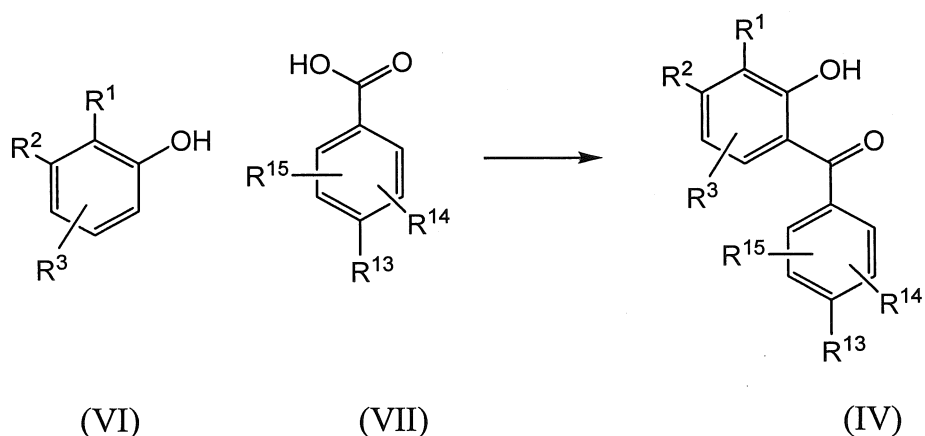
trong đó trong hợp chất có công thức (II) R^1 , R^3 , và R^{10} đến R^{15} là như được xác định trong khía cạnh thứ nhất, và R^2 là OAc hoặc như được xác định trong khía cạnh thứ nhất, và trong hợp chất có công thức (IV) R^1 đến R^3 và R^{13} đến R^{15} là như

được xác định trong khía cạnh thứ nhất, và trong hợp chất có công thức (V) R^{10} đến R^{12} là như được xác định trong khía cạnh thứ nhất.

Bước (c) có thể được thực hiện với sự có mặt của bazơ.

Theo một phương án khác, phương pháp này còn có thể bao gồm bước:

(d) cho hợp chất có công thức (VI) phản ứng với hợp chất có công thức (VII) để tạo ra hợp chất có công thức (IV)



trong đó R^1 đến R^3 , và R^{13} đến R^{15} là như được xác định trong khía cạnh thứ nhất.

Bước (d) có thể được thực hiện bằng cách kết hợp các hợp chất (VI) và (VII) với sự có mặt của phospho oxyclorea và kẽm clorua. Theo một phương án khác, bước (d) có thể được thực hiện bằng cách cho hợp chất (VII) phản ứng với thionyl clorua, tiếp theo sau đó phản ứng với nhôm clorua và hợp chất (VI).

Các định nghĩa

Sau đây là một số định nghĩa mà có thể là hữu ích để hiểu phần mô tả của sáng chế. Các định nghĩa này được dự định là các định nghĩa chung và sẽ không giới hạn phạm vi của sáng chế ở chỉ riêng các thuật ngữ đó, nhưng đưa ra để hiểu rõ hơn về phần mô tả dưới đây.

Trong suốt phần mô tả này, trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "chứa", hoặc các biến thể như "gồm" hoặc "bao gồm", sẽ được hiểu là ngụ ý bao gồm thành phần, số nguyên hoặc bước được nêu, hoặc nhóm các thành phần, số nguyên hoặc bước,

nhưng không loại trừ thành phần, số nguyên hoặc bước khác bất kỳ, hoặc nhóm các thành phần, số nguyên hoặc bước.

Thuật ngữ "một" được sử dụng ở đây để chỉ một hoặc nhiều hơn một (tức là ít nhất là một) đối tượng. Ví dụ, "một thành phần" nghĩa là một thành phần hoặc nhiều hơn một thành phần.

Trong phạm vi phần mô tả này, thuật ngữ "alkyl" được hiểu là nhóm hydrocacbon no hóa trị một mạch thẳng hoặc mạch nhánh có số nguyên tử cacbon được mô tả. Ví dụ về nhóm alkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, metyl, etyl, 1-propyl, isopropyl, 1-butyl, 2-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, amyl, 1,2-dimethylpropyl, 1,1-dimethylpropyl, pentyl, isopentyl, hexyl, 4-methylpentyl, 1-methylpentyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 2,2-dimethylbutyl, 3,3-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 1,3-dimethylbutyl, 1,2,2-trimethylpropyl, và 1,1,2-trimethylpropyl.

Trong phạm vi của phần mô tả này, thuật ngữ "alkoxy" được hiểu là nhóm O-alkyl trong đó alkyl là như được xác định ở đây. Ví dụ về nhóm alkoxy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metoxy, etoxy, *n*-propoxy, isopropoxy, *sec*-butoxy và *tert*-butoxy.

Trong phạm vi của phần mô tả này, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" bao gồm lượng đủ nhưng không độc của hoạt chất để tạo ra tác dụng được nêu. Khi được sử dụng cùng với sự tái phát bệnh ung thư, "lượng hữu hiệu" nghĩa là lượng hợp chất có công thức (I) cần để làm giảm sự tái phát, hoặc nguy cơ tái phát bệnh ung thư. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng lượng chính xác của hợp chất cần thiết sẽ thay đổi dựa vào nhiều yếu tố và do đó không thể xác định "lượng hữu hiệu" chính xác. Tuy nhiên, đối với trường hợp được đưa ra, "lượng hữu hiệu" thích hợp có thể được xác định bởi chuyên gia bình thường trong lĩnh vực này.

Trong phạm vi của phần mô tả này, thuật ngữ "lượng hữu hiệu để điều trị" bao gồm lượng đủ nhưng không độc của hoạt chất để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn. Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thấy rằng lượng chính xác của hợp chất cần thiết sẽ thay đổi dựa vào nhiều yếu tố và do đó không thể xác định "lượng hữu hiệu để điều trị" chính xác. Tuy nhiên, đối với trường

hợp bất kỳ được đưa ra, “lượng hữu hiệu để điều trị” thích hợp có thể được xác định bởi chuyên gia bình thường trong lĩnh vực này.

Trong phạm vi của phần mô tả này, thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị", "ngăn ngừa" và "việc ngăn ngừa" chỉ việc ứng dụng bất kỳ và mọi ứng dụng mà chữa khỏi bệnh ung thư hoặc các triệu chứng của chúng, ngăn ngừa sự tạo thành bệnh ung thư, hoặc theo cách khác ngăn ngừa, cản trở, làm chậm hoặc làm đảo ngược sự tiến triển của bệnh ung thư hoặc các triệu chứng không mong muốn khác theo cách bất kỳ nào. Do đó, thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị", "ngăn ngừa" và "việc ngăn ngừa" và tương tự phải được xem xét trong phạm vi rộng nhất của chúng. Ví dụ, việc điều trị không nhất thiết ngụ ý rằng đối tượng được điều trị cho đến khi hồi phục hoàn toàn.

Trong phạm vi của phần mô tả này, thuật ngữ "đối tượng" bao gồm người và cả động vật không phải người. Như vậy, ngoài việc là hữu ích để điều trị bệnh ung thư ở người, các hợp chất theo sáng chế còn tìm thấy để sử dụng để điều trị bệnh ung thư ở động vật không phải người, ví dụ, động vật có vú như động vật nuôi làm bạn và động vật nuôi ở trang trại. Ví dụ về động vật nuôi làm bạn và động vật nuôi ở trang trại bao gồm chó, mèo, ngựa, bò, cừu và lợn. Tốt hơn, nếu đối tượng là người.

Trong phạm vi của phần mô tả này thuật ngữ "tái phát" khi nó đề cập đến bệnh ung thư được hiểu là việc quay trở lại của các tế bào ung thư và/hoặc khối u gây ung thư sau khi các tế bào ung thư và/hoặc khối u gây ung thư đã được điều trị thành công trước đó.

Trong phạm vi của phần mô tả này thuật ngữ “sử dụng” và các biến thể của nó bao gồm “sử dụng” và “việc sử dụng”, bao gồm cho tiếp xúc, áp dụng, phân phối hoặc cung cấp hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế cho cơ thể bằng các cách thích hợp bất kỳ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ thể hiện hoạt tính khác biệt của hợp chất 2 chống lại hai mô cấy thu được từ bệnh nhân GBM khác nhau; GBM14-CHA (hình thoi) và ODA14-RAV (hình vuông).

Fig.2 là sơ đồ thể hiện hoạt tính khác biệt của hợp chất 2 và chất đồng phân đối ảnh được tinh chế của nó chống lại mô cấy thu được từ bệnh nhân GBM14 GBM.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện sự phân tích hiệu quả của hợp chất 2 chống lại các tế bào OCSC-2 bằng cách sử dụng ảnh hợp dòng (A, B), và gây hại tế bào (C, D). IC₅₀ được tính toán từ đồ thị AUC đối với sự hợp dòng và cường độ huỳnh quang theo thời gian. Việc tính toán IC₅₀ được thực hiện sau 72 giờ nuôi cấy.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện sự phân tích hiệu quả của hợp chất 2 chống lại các tế bào OCSC-2 bằng cách sử dụng sự hợp dòng. Việc tính toán IC₅₀ được thực hiện sau 72 giờ nuôi cấy. Ở đây, GAD 305 là hợp chất 9 và GAD 310 là hợp chất 13.

Fig.5 là sơ đồ thể hiện sự đánh giá raxemat của hợp chất 2 (A, C) và eutome của nó (B, D) chống lại các dòng tế bào A172 (u thần kinh đệm) (A và B) và OVCAR-3 (bệnh ung thư buồng trứng) (C và D).

Fig.6 là sơ đồ thể hiện khả năng của hợp chất 2 làm chậm quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư buồng trứng.

Fig.7 là ảnh soi bằng kính hiển vi các tế bào OCSC2 được xử lý bằng hợp chất 2 với lượng 1µg/ml trong 24 giờ (B) và 48 giờ (C) so với mẫu đối chứng, 72 giờ (A).

Fig.8 là ảnh soi kính hiển vi huỳnh quang các tế bào gốc OCSC-2 được đánh dấu bằng GFP và đồng môi trường nuôi cấy OCC2 được đánh dấu bằng mCherry được xử lý bằng hợp chất 2 với lượng 1µg/ml trong 48 giờ (B) so với mẫu đối chứng (A).

Fig.9 là ảnh thể hiện hợp chất 2 phá hủy dạng hình cầu của tế bào gốc ung thư buồng trứng. Dạng hình cầu OCSC-2 được tạo ra bằng cách sử dụng hệ phương pháp tiêu chuẩn và được cho tiếp xúc để làm tăng nồng độ hợp chất 2 trong 24 giờ. A, mẫu đối chứng; B, 0,1µg/ml – 24 giờ; C, 1µg/ml – 24 giờ. Cấu trúc hình cầu được đánh giá bằng kính hiển vi.

Fig.10 là sơ đồ thể hiện profin dược động học (pharmacokinetic-PK) của các hợp chất 2, 6, 9 và 13 (được đánh dấu là 31) với lượng 1mg/kg được phân phối trong 30% chế phẩm Captisol®.

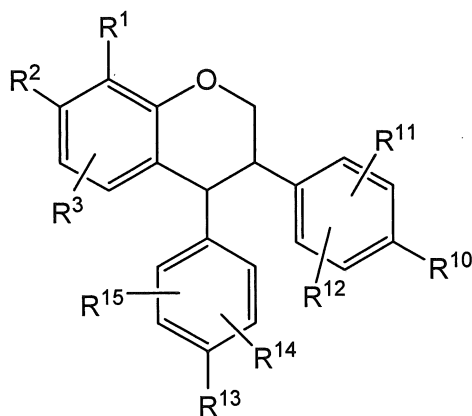
Fig.11 là sơ đồ thể hiện hiệu quả *in vivo* của eutome của hợp chất 9 chống lại mô hình bên hông của GBM (U87MG). Bằng cách sử dụng mô hình bên hông U87 được mô tả trước đó, chuột được chia thành hai nhóm, nhóm điều trị (eutome của hợp chất 9) được điều chế trong nền thuốc đạn bơ cacao và liều hằng ngày với lượng 100mg/kg – và nhóm đối chứng thuốc đạn ($n = 10$ đối với mẫu đối chứng và $n = 4$ đối với hợp chất 9). Chuột được quan sát hằng ngày, cân mỗi ngày thứ ba và được an tử sau 12 ngày điều trị. Khi kết thúc việc điều trị, các khối u được cắt và cân. Hợp chất 9 được sử dụng hằng ngày với lượng 100mg/kg trong chế phẩm thuốc đạn trong khi các con vật đối chứng được cho dùng liều chỉ bằng chế phẩm thuốc đạn. Đường cong phát triển khối u (giá trị trung bình $\pm$ SEM) đối với quy mô điều trị (12 ngày) là khác biệt đáng kể (giá trị P được thể hiện). Trọng lượng khối u (trung bình và điểm tứ phân vị) cũng được giảm đáng kể (giá trị P được thể hiện phía trên đồ thị).

Fig.12 là sơ đồ thể hiện hiệu quả *in vivo* của eutome của hợp chất 2 trong mô hình động vật bị bệnh ung thư buồng trứng. Các con vật được cấy truyền bằng các tế bào OCSC1-F2 m-Cherry và sau đó cho dùng liều vào ngày 4 sau khi cấy truyền bằng eutome của hợp chất 2 được tạo ra từ Captisol® bằng cách sử dụng hai phác đồ khác nhau (100mg/kg, trong màng bụng, mỗi ngày một lần, 50mg/kg, trong màng bụng) và hiệu quả được so với mẫu đối chứng. A, cường độ huỳnh quang trung bình của khối u (khối u được tạo ảnh mỗi ngày thứ ba bằng cách sử dụng hệ thống tạo ảnh Vivo FX Imaging, ROI)●, mẫu đối chứng Captisol®; ■, eutome của hợp chất 2 (50mg/kg trong màng bụng hằng ngày); ▲, eutome của hợp chất 2 (100mg/kg trong màng bụng hằng ngày); B, trọng lượng trung bình khối u giai đoạn cuối được đánh giá bằng cách loại bỏ và cân tất cả các khối u từ cả con vật được điều trị bằng mẫu đối chứng và bằng eutome của hợp chất 2 được điều chế từ Captisol®, *, $p < 0,02$; **, $p < 0,0001$; so với mẫu đối chứng tương ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất benzopyran được chọn có công thức chung (I), điều chế các hợp chất này và sử dụng chúng để điều trị bệnh ung thư và giảm tỷ lệ tái phát bệnh ung thư. Hợp chất được mô tả ở đây là sáng chế chọn lọc đối với US2012/0251630 và WO2012/061409.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức chung (I):



(I)

hoặc muối được dụng, hydrat, dẫn xuất, hoặc solvat của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_6 alkyl,

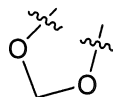
R^2 được chọn từ nhóm bao gồm: OH và C_1 - C_6 alkoxy,

R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_6 alkyl và halo,

R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OH, C_1 - C_6 alkoxy, NH_2 , $NHMe$, $NHEt$, $N(Me)_2$ và $N(Et)_2$,

R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, OH, C_1 - C_6 alkyl và halo, hoặc

R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} cùng nhau tạo thành cấu trúc sau:



R^{10} là OH, và

R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, C_1 - C_4 alkyl, và F.

Theo một phương án, R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_3 alkyl.

Theo một phương án khác, R^2 là OH hoặc OMe. Theo một phương án khác, R^2 là OH.

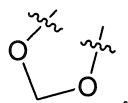
Theo một phương án khác nữa, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_3 alkyl và halo. Theo một phương án khác, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_3 alkyl, F và Cl.

Theo một phương án khác, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, methyl, *tert*-butyl và F. Theo một phương án khác nữa, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, methyl, *tert*-butyl và F. Theo một phương án khác nữa, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, *tert*-butyl và F. Theo một phương án khác nữa, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, *tert*-butyl và F.

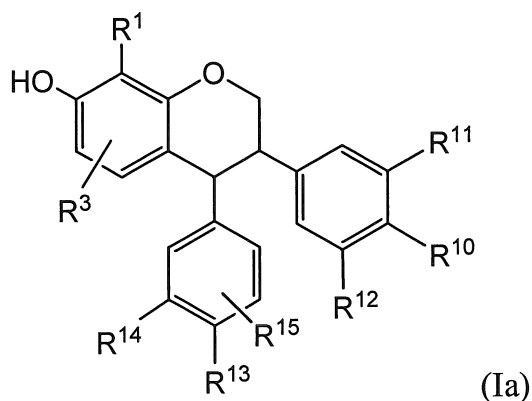
Theo một phương án khác, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, NH_2 , $NHET$ và $N(Et)_2$.

Theo một phương án khác, R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F, Cl và methyl.

Theo một phương án khác nữa, R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành công thức sau:



Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có cấu trúc sau:



trong đó R^1 , R^3 và R^{10} đến R^{15} là như nêu trên.

Theo một phương án, R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_3 alkyl.

Theo một phương án khác, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_3 alkyl, F và Cl.

Theo một phương án khác nữa, R^{11} được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, OMe, methyl và F.

Theo một phương án khác, R^{12} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, methyl, *tert*-butyl và F.

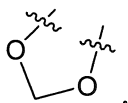
Theo một phương án khác nữa, R^{11} được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, OMe, và F.

Theo một phương án khác, R^{12} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, *tert*-butyl và F.

Theo một phương án khác nữa, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, NH_2 , $NHEt$ và NEt_2 .

Theo một phương án khác, R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, halo và methyl. Theo một phương án khác, R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F, Cl và methyl.

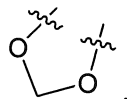
Theo một phương án khác nữa, R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành công thức sau:



Theo một phương án, R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_3 alkyl, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_3 alkyl, F và Cl, R^{10} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, OH và F, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, methyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe và OH và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F, Cl và methyl.

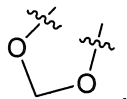
Theo một phương án khác, R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_3 alkyl, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_3 alkyl, F và Cl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, methyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe và OH và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao

gồm: H, F, Cl và methyl, hoặc R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành công thức sau:



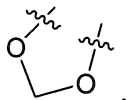
Theo một phương án khác, R^1 và R^3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, methyl hoặc ethyl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, methyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe và OH và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F và methyl. Theo phương án này, R^{15} có thể là ortho hoặc meta đối với R^{13} .

Theo một phương án khác, R^1 và R^3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, methyl hoặc ethyl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, methyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe và OH và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F và methyl, hoặc R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành công thức sau:



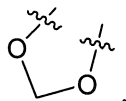
Theo một phương án, R^1 và R^3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, methyl hoặc ethyl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe và OH và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F và methyl. Theo phương án này, R^{15} có thể là ortho đối với R^{13} .

Theo một phương án khác, R^1 và R^3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, methyl hoặc ethyl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe và OH và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F và methyl, hoặc R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành công thức sau:

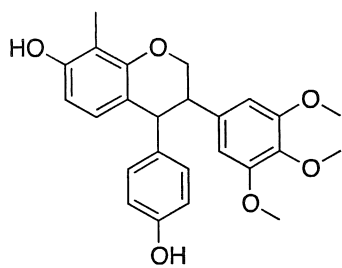


Theo một phương án, R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1-C_3 alkyl, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1-C_3 alkyl, F và Cl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, methyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, OH, NH_2 , NEt và NEt_2 và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F, Cl và methyl.

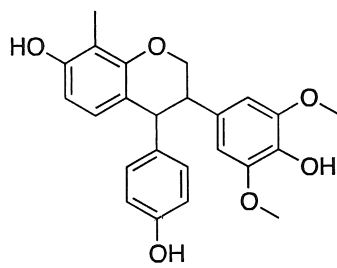
Theo một phương án khác, R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1-C_3 alkyl, R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1-C_3 alkyl, F và Cl, R^{10} là OH, R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: *tert*-butyl, methyl, OMe và F, R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, OH, NH_2 , NEt và NEt_2 và R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F, Cl và methyl, hoặc R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành công thức sau:



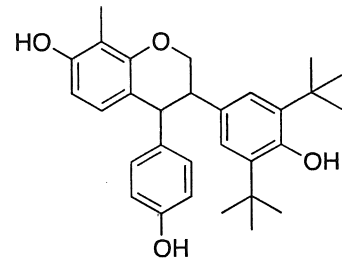
Các hợp chất theo công thức (I) làm ví dụ bao gồm các hợp chất 2, 3, 6, 9, 11, 13 và từ 15 đến 41 (sau đây được gọi là các hợp chất được đánh số theo sáng chế):



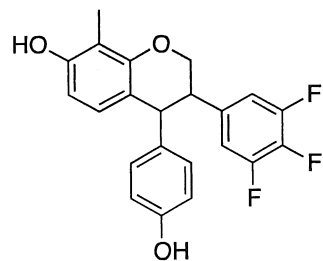
1



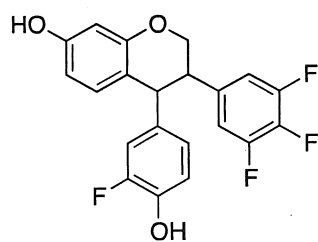
2



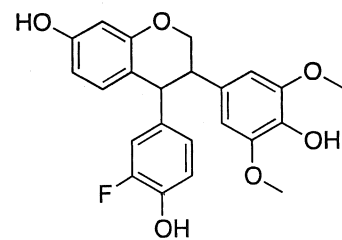
3



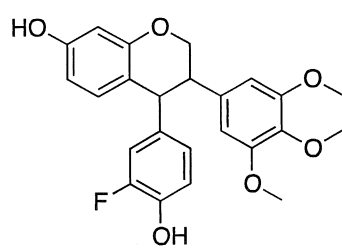
4



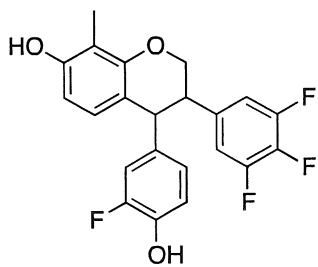
5



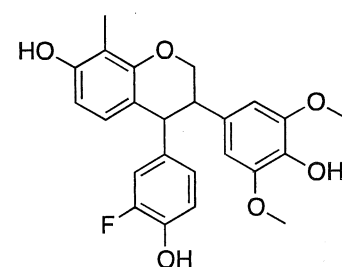
6



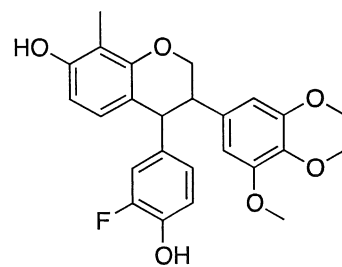
7



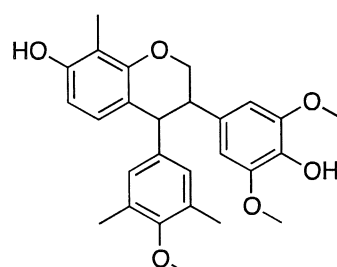
8



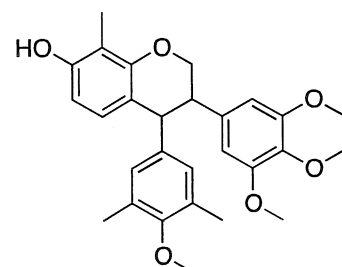
9



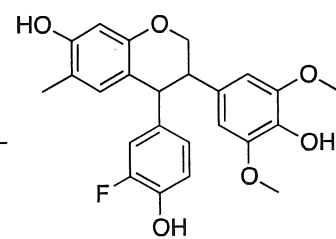
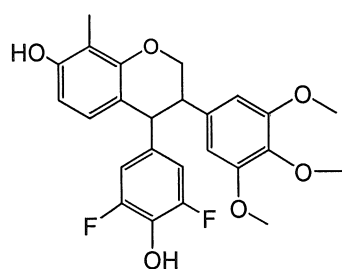
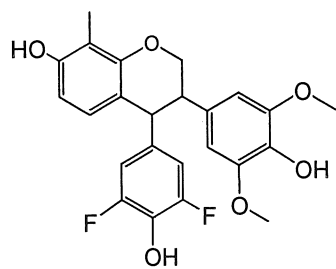
10



11



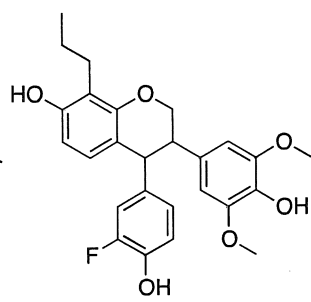
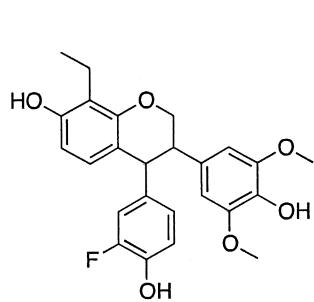
12



13

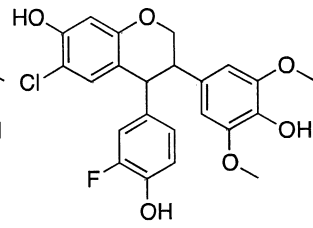
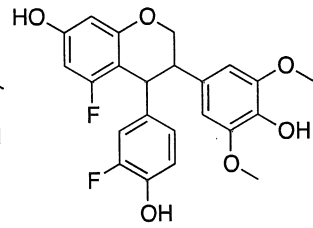
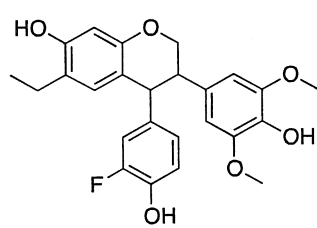
14

15



16

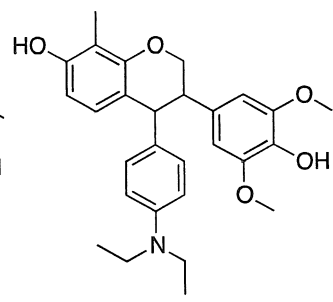
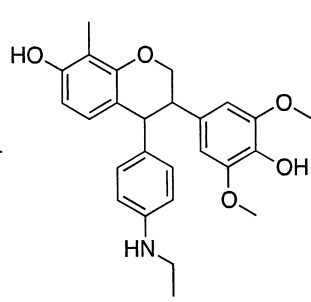
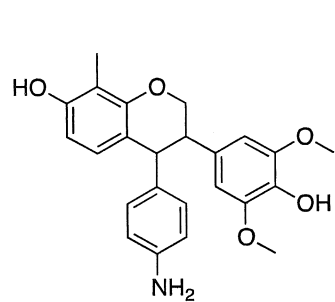
17



18

19

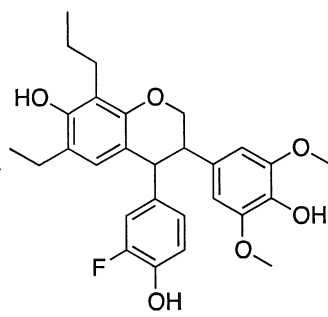
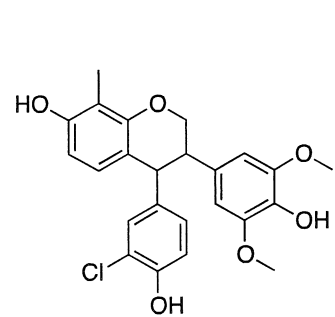
20



21

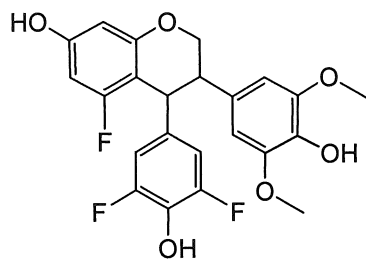
22

23

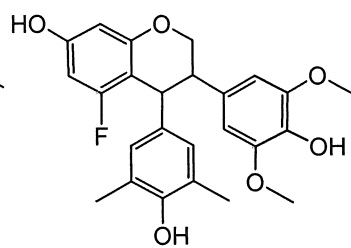


24

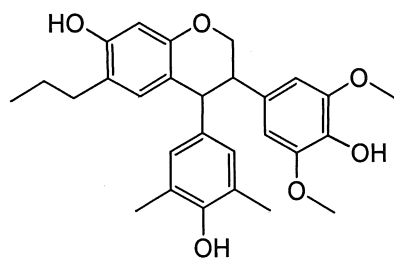
25



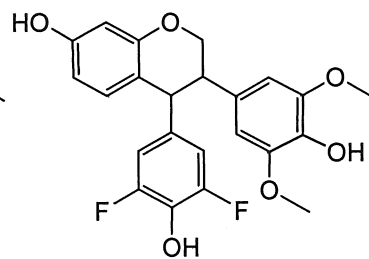
26



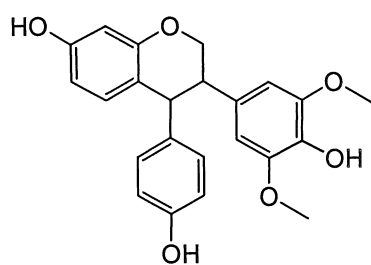
27



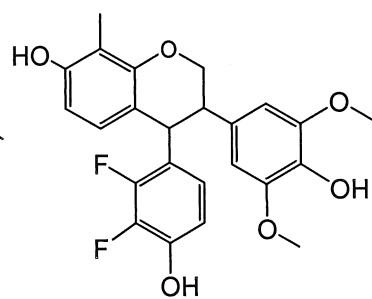
28



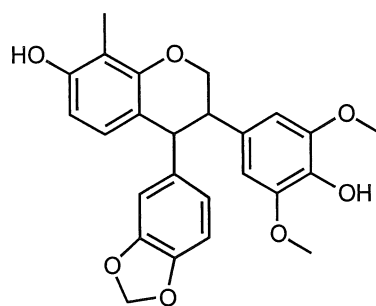
29



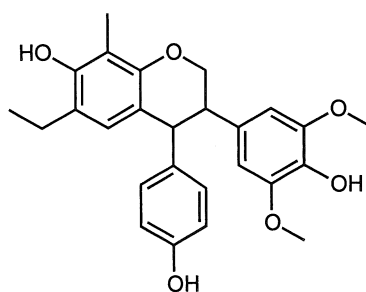
30



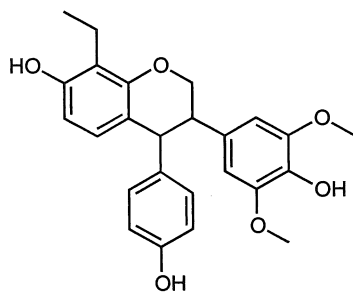
31



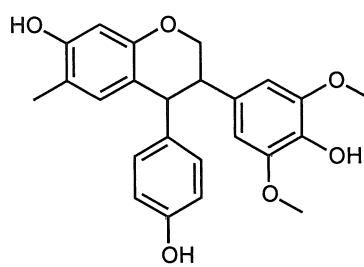
32



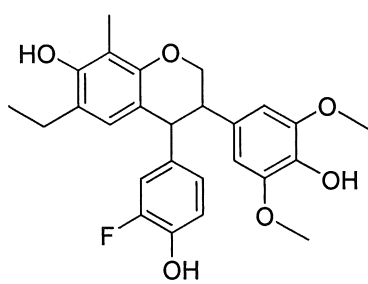
33



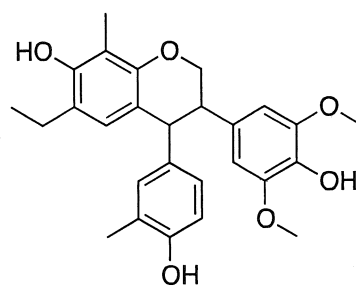
34



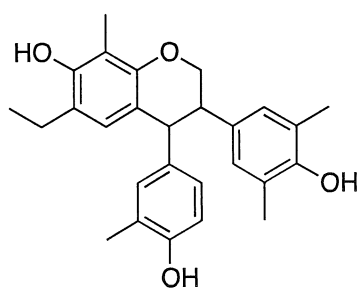
35



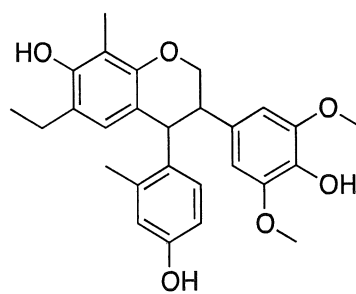
36



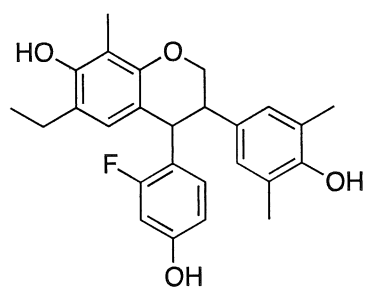
37



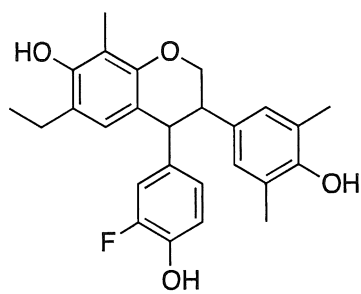
38



39



40



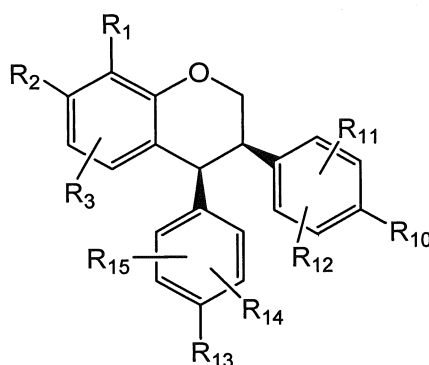
41

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất từ 2, 6, 9, 13, 16, 18-22, 24 và 32-41. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất từ 2, 6, 9, 13, 16, 18-22, 24 và 32-40. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất từ 2, 6, 9, 13, 16, 18-22, 24 và 32-36. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất từ 2, 6, 9, 13, 16, 18-22, 24 và 32-35. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất 33 và 36 đến 41. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm: các hợp chất 33, 36, 37 và 39. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất 2, 9 và 36. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất 2, 9, 20, 33 và 36. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ các hợp chất 2, 9, 33 và 36. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 13 và 36 đến 41. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất 2, 6, 9, 13 và 36 đến 40. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất 2, 6, 9, 13, 36, 37 và 39. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) là hợp chất 2. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) là hợp chất 9. Theo một phương án khác, hợp chất có công thức (I) là hợp chất 36. Theo các phương án khác, hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế.

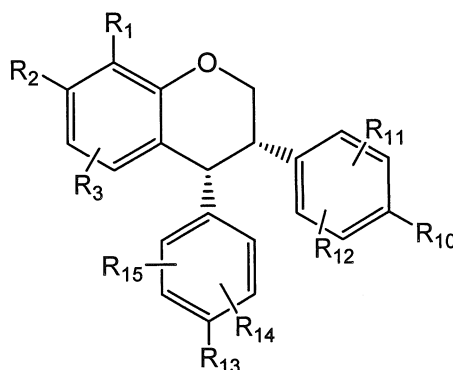
Hợp chất có công thức (I) bao gồm ít nhất hai tâm đối xứng. Sáng chế bao gồm tất cả dạng đồng phân đối ảnh và đồng phân không đối quang cũng như hỗn hợp của chúng theo tỷ lệ bất kỳ. Sáng chế còn mở rộng đến dạng đồng phân đối ảnh được tách hoặc cặp đồng phân đối ảnh. Phương pháp tách chất đồng phân đối ảnh và đồng phân không đối quang là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một vài phương án, hợp chất có công thức (I) là hỗn hợp raxemic. Theo các phương án khác, hợp chất có công thức (I) có mặt ở dạng tinh khiết về mặt quang học.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng sẽ thừa nhận rằng trong hợp chất có công thức (I), các nhóm thế phenyl được gắn vào nhân dị vòng có thể là *cis* hoặc *trans* so với nhau. Tốt hơn, nếu trong hợp chất có công thức (I), các nhóm thế này sẽ là *cis* so với nhau. Theo cách khác, trong hợp chất có công thức (I), các nhóm thế này có thể là *trans* so với nhau.

Theo một vài phương án, hợp chất có công thức (I) bao gồm các hợp chất được đánh số theo sáng chế có cấu trúc sau:



Theo các phương án khác, hợp chất có công thức (I) bao gồm các hợp chất được đánh số theo sáng chế có cấu trúc sau:



Hợp chất có công thức (I) cũng bao gồm hydrat và solvat. Solvat là phức được tạo thành bởi sự kết hợp của các phân tử dung môi với hợp chất có công thức (I). Trong trường hợp hợp chất có công thức (I) là rắn, người có hiểu biết trung bình

trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các hợp chất này có thể tồn tại ở dạng kết tinh hoặc đa hình khác nhau, tất cả chúng được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

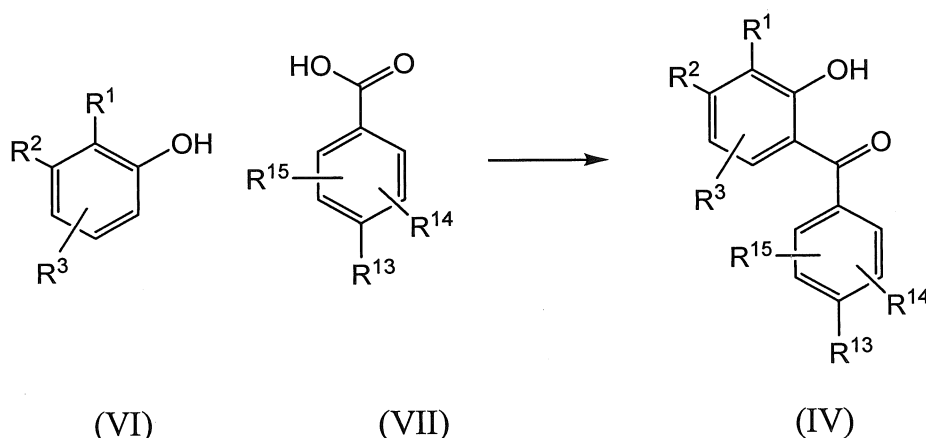
Hợp chất có công thức (I) có thể ở dạng muối được dụng. Các muối này đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. S. M. Berge *et al.* mô tả muối được dụng chi tiết trong tài liệu: *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66:1-19. Muối được dụng có thể được điều chế *in situ* khi tách và tinh chế cuối cùng hợp chất có công thức (I), hoặc theo cách riêng biệt bằng cho hợp chất bazơ tự do phản ứng với axit hữu cơ thích hợp. Muối cộng axit được dụng của các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế từ axit vô cơ hoặc từ axit hữu cơ. Ví dụ về axit vô cơ như vậy là axit clohydric, axit bromhydric hóa, axit hydroiodic, axit nitric, axit cacbonic, axit sulfuric, và axit phosphoric. Axit hữu cơ thích hợp có thể được chọn từ axit béo, axit xycloaliphatic, axit thơm, axit carboxylic dị vòng và các nhóm sulfonic của axit hữu cơ, ví dụ về chúng là axit formic, axit axetic, axit propionic, axit succinic, axit glycolic, axit gluconic, axit lactic, axit malic, axit tartric, axit xitric, axit ascorbic, axit glucoronic, axit fumaric, axit maleic, axit pyruvic, axit alkyl sulfonic, axit arylsulfonic, axit aspartic, axit glutamic, axit benzoic, axit antranilic, axit mesylic, axit salixylic, axit p-hydroxybenzoic, axit phenylaxetic, axit mandelic, axit ambonic, axit pamoic, axit pantothenic, axit sulfanilic, axit xyclohexylaminosulfonic, axit stearic, axit algenic, axit β -hydroxybutyric, axit galactaric, và axit galacturonic. Muối cộng bazơ được dụng thích hợp của các hợp chất theo sáng chế bao gồm muối kim loại được tạo ra từ lithi, natri, kali, magie, canxi, nhôm, và kẽm, và các muối hữu cơ được tạo ra từ bazơ hữu cơ như cholin, dietanolamin, morpholin. Theo cách khác, muối hữu cơ được tạo ra từ N,N'-dibenzyletylendiamin, cloprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, meglumin (N-metylglucamin), procain, muối amoni, muối bậc bốn như muối tetrametylamoni, muối cộng axit amin như muối với glyxin và arginin.

Hợp chất có công thức (I) còn bao gồm tất cả các dẫn xuất với nhóm rời chuyển có thể tách sinh lý mà có thể tách *in vivo* để tạo ra hợp chất có công thức (I). Các nhóm rời chuyển thích hợp bao gồm axyl, phosphat, sulfat, sulfonat, và tốt hơn là hợp chất được thể mono-, di- và per-axyl oxy, trong đó một hoặc nhiều nhóm

hydroxy treo được bảo vệ bằng nhóm axyl, tốt hơn là nhóm axetyl. Thông thường, các hợp chất được thể axyloxy dễ dàng tách thành hợp chất được thể hydroxy tương ứng.

Hợp chất có công thức (I) đại diện có thể được điều chế như được mô tả dưới đây.

Trong bước thứ nhất của quá trình điều chế, hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) được điều chế từ phenol được chức hóa thích hợp có công thức (VI) và axit benzoic được chức hóa thích hợp có công thức (VII) theo sơ đồ 1.



Sơ đồ 1: Điều chế hợp chất trung gian benzophenon

Vị trí tương ứng của nhóm thế R_{14} và R_{15} trên vòng phenyl của hợp chất (VII) có thể được chọn dựa vào kiểu thế cần thiết trên vòng 4-phenyl của hợp chất có công thức (I) được điều chế. Khi thích hợp hoặc cần thiết, nhóm bảo vệ có thể được sử dụng. Nhóm bảo vệ tiêu chuẩn là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các nhóm được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: '*Protective Groups in Organic Synthesis*' by Theodora Greene and Peter Wuts (Third edition, 1999, John Wiley and Sons).

Thông thường, trong phản ứng được nêu trên sơ đồ 1, hợp chất phenolic có công thức (VI) và hợp chất axit benzoic (VII) được cho phản ứng trong điều kiện axyl hóa. Ví dụ, theo một phương pháp được mô tả trong tài liệu: *Indian Journal of Chemistry*, 1971, 619-62, hợp chất phenolic có công thức (VI) và hợp chất axit benzoic (VII) có thể được kết hợp với phospho oxyclozua và kẽm clorua và hỗn hợp

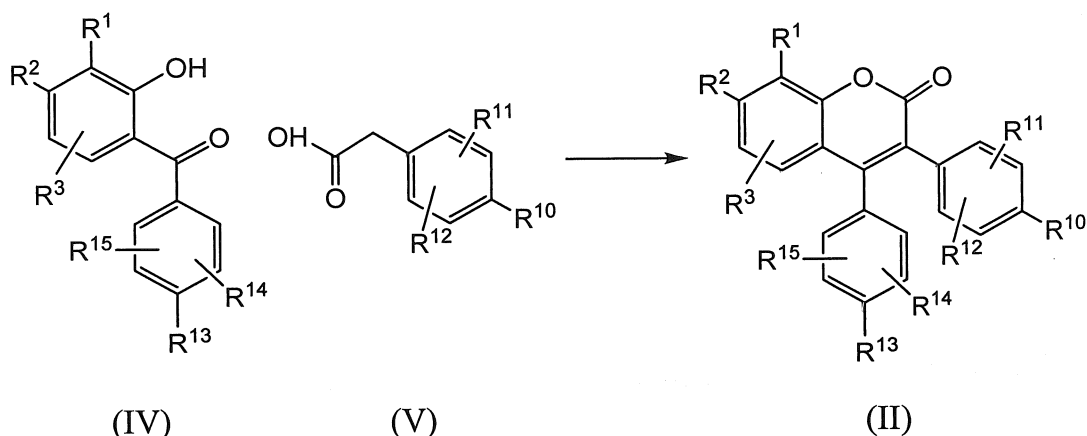
này được đun nóng trong khoảng thời gian đủ để phản ứng tiến hành gần như hoàn toàn. Khoảng thời gian chính xác sẽ tùy thuộc vào quy mô phản ứng, tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng có thể xác định thời gian và điều kiện nhiệt độ thích hợp. Trong phản ứng thông thường, chất phản ứng được đun nóng ở nhiệt độ khoảng 70°C trong thời gian từ 1 đến 3 giờ. Khi phản ứng được phán đoán là hoàn toàn kết thúc, hỗn hợp phản ứng được làm nguội, ví dụ, bằng cách rót lên trên nước đá, sau đó, hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) có thể được tách và tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương pháp khác, hợp chất axit benzoic (VII) có thể được khuấy trong khi hồi lưu thionyl clorua trong thời gian từ 2 đến 6 giờ, tiếp đó bổ sung *N,N*-dimetylformamit có tác dụng làm xúc tác trong dung môi hữu cơ thích hợp (ví dụ, diclometan), trong thời gian từ 20 phút đến 1 giờ. Sau khi loại bỏ thionyl clorua dư, hỗn hợp này thường được làm nguội (ví dụ, trong bể nước đá) sau đó nhôm clorua và hợp chất phenolic có công thức (VI) được bổ sung và hỗn hợp này được khuấy trong khoảng thời gian thích hợp, thường là từ 18 đến 36 giờ, trong khi làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng, sau đó đun nóng ở hồi lưu trong thời gian từ 2 đến 8 giờ. Phản ứng này có thể được thực hiện trong môi trường trơ.

Hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) có thể được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) có thể được thu gom bằng cách lọc, rửa (ví dụ, bằng nước), sau đó tái kết tinh từ hệ dung môi thích hợp. Ví dụ về dung môi tái kết tinh bao gồm metanol, etanol, nước và hỗn hợp của chúng. Theo cách khác, hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) có thể được tinh chế bằng sắc ký cột.

Bước tiếp theo của quá trình điều chế bao gồm phản ứng của hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) với axit phenylcarboxylic chức hóa thích hợp có công thức (V) để tạo ra benzopyranon chức hóa có công thức (II) (xem sơ đồ 2). Vị trí tương ứng của nhóm thế R_{11} và R_{12} trên vòng phenyl của hợp chất (V) có thể được chọn dựa vào kiểu thế cần thiết trên vòng 3-phenyl của hợp chất có công thức

(I) được điều chế. Khi thích hợp hoặc cần thiết, nhóm bảo vệ có thể được sử dụng.

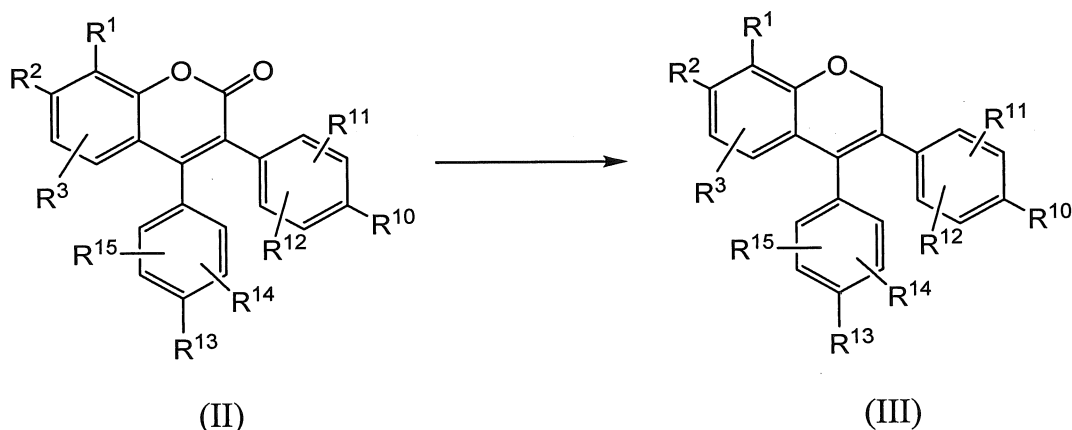


Sơ đồ 2: Điều chế benzopyranon chức hóa

Thông thường, trong phản ứng ngưng tụ được nêu trên sơ đồ 2, hợp chất trung gian benzophenon có công thức (IV) được cho phản ứng với axit phenylaxetic chức hóa có công thức (V) với sự có mặt của bazơ và anhydrit axetic. Thông thường, bazơ này là bazơ không ái nhân, như *N,N*-diisopropyletyl amin (DIEA), *N*-metylmorpholin hoặc trietylamin. Trong phản ứng này, nhóm thế hydroxy bất kỳ có mặt trên vòng phenyl có thể được chuyển hóa thành axetat tương ứng. Thông thường, phản ứng này được thực hiện kết hợp với đun nóng ở nhiệt độ và trong khoảng thời gian cho đến khi phản ứng được phán đoán là gần như kết thúc (ví dụ, bằng phân tích TLC hoặc GC). Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng khoảng thời gian thích hợp sẽ tùy thuộc vào quy mô phản ứng và các chất phản ứng được sử dụng. Thông thường, các chất phản ứng có thể được làm ấm đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C (ví dụ, khoảng 50°C) trong thời gian từ 20 đến 30 phút để đảm bảo rằng tất cả các chất phản ứng đều ở trong dung dịch, sau đó đun nóng ở nhiệt độ cao hơn, như nhiệt độ nằm trong khoảng từ 130 đến 150°C (ví dụ, khoảng 135°C), trong thời gian từ 6 đến 48 giờ (ví dụ, khoảng 18 giờ). Benzopyranon chức hóa có công thức (II) có thể được tách bằng cách chuyển hóa, như chiết dung môi (ví dụ, bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ như etyl axetat, clorofom, hoặc tương tự), và rửa bằng dung dịch kiềm (ví dụ, natri cacbonat, hoặc dung dịch natri hydro cacbonat), tiếp đó tinh chế chuẩn bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như sắc ký cột, tái kết tinh ra khỏi dung môi thích hợp (ví dụ, ethanol hoặc

hỗn hợp etanol/nước), hoặc nghiền với dung môi thích hợp (ví dụ, metanol, etanol hoặc hỗn hợp của chúng).

Bước tiếp theo của quá trình điều chế bao gồm khử lacton của benzopyranon chức hóa có công thức (II) để tạo ra hợp chất cromen chức hóa có công thức (III) (xem sơ đồ 3).

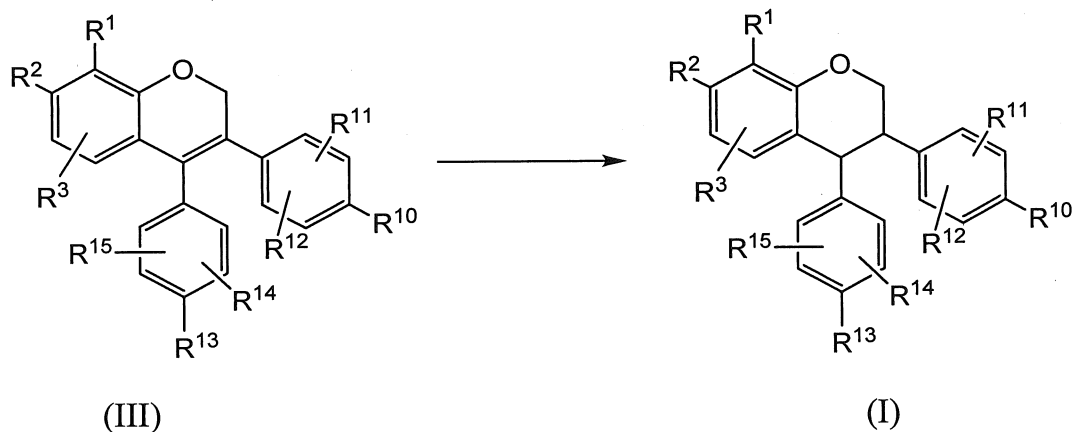


Sơ đồ 3. Điều chế cromen chức hóa

Thông thường, phản ứng khử được thực hiện bằng cách xử lý benzopyranon có công thức (II) bằng chất khử thích hợp có khả năng khử nhóm keton của vòng pyranon. Tốt hơn, nếu chất phản ứng khử khử chọn lọc nhóm keton của vòng pyranon nhưng không khử liên kết đôi 3,4. Việc khử cũng có thể khử bảo vệ nhóm hydroxy được axyl hóa bất kỳ có mặt trên vòng phenyl. Chất phản ứng khử thích hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm chất phản ứng boran, như, ví dụ, phức boran dimetylsulfua, decboran, 9-BBN và phức boran tetrahydrofuran. Theo một vài phương án, chất khử là boran dimetylsulfua. Việc khử có thể được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách sử dụng chất phụ trợ đối xứng. Ví dụ, boran dimetylsulfua có thể phù hợp với việc khử keton không đối xứng bằng cách sử dụng chất xúc tác oxazaborolidin đối xứng (Corey, E.J.; Helal, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 1986). Phản ứng này có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ, như tetrahydrofuran, toluen hoặc clorofom. Phản ứng có thể được thực hiện trong môi trường trơ ở nhiệt độ dưới nhiệt độ trong phòng, thông thường ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến 10°C, hoặc ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến 0°C, hoặc ở nhiệt độ 0°C, trong thời gian từ 15 phút đến 4 giờ, thường là trong khoảng từ 30 phút đến 2 giờ. Khi phản ứng khử được dự đoán

là kết thúc (hoặc gần như kết thúc) sản phẩm có thể được tách bằng cách xử lý bằng axit bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn đã biết đối với chuyên gia, sau đó tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường như sắc ký cột.

Với hợp chất cromen có công thức (III) được khử hoàn toàn, bước cuối cùng trong quá trình điều chế bao gồm khử cisoid chất xúc tác olefin của hợp chất cromen có công thức (III) để tạo ra hợp chất có công thức (I) (xem sơ đồ 4).



Sơ đồ 4. Khử xúc tác để tạo ra hợp chất có công thức (I)

Việc khử liên kết đôi có thể được thực hiện bằng cách hydro hóa sử dụng chất phản ứng và các điều kiện đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất phản ứng thích hợp bao gồm chất xúc tác kim loại không đồng nhất, như chất xúc tác paladi và platin với sự có mặt của hydro. Chất xúc tác được ưu tiên hiện tại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất xúc tác Pd/C, Pd(OH)₂/C, Pt/C, Raney Nickel, Rh, bao gồm chất xúc tác Rh đối xứng, như chất xúc tác Rh DIPAMP và Wilkinsons. Ví dụ về các dung môi thích hợp bao gồm metanol và etanol. Phản ứng có thể được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng hoặc hỗn hợp phản ứng có thể được đun nóng (ví dụ, đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 60°C). Theo cách khác, phản ứng hydro hóa có thể được thực hiện dưới áp suất. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng có thể xác định khi phản ứng kết thúc (hoặc gần như kết thúc) bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn (ví dụ, TLC, GC-MS). Sản phẩm có thể được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn (ví dụ, sắc ký).

Sau khi tinh chế, hợp chất có công thức (I) có thể là gần như tinh khiết. Ví

dự, hợp chất có công thức (I) có thể được tách ở dạng tinh khiết ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% hoặc 99,9%.

Hợp chất có công thức (I) có thể thu được ở dạng hỗn hợp racemic. Chất đồng phân đối ảnh có thể được tách bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm phân giải đối xứng, sắc ký lỏng siêu tới hạn và điều chế chọn lọc đối ảnh. Chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ có thể được tách ở dạng gần như tinh khiết hoặc ở dạng dư chất đồng phân đối ảnh (enantiomeric excess-ee). Ví dụ, theo các phương án được ưu tiên, chất đồng phân đối ảnh có thể được tách ở dạng dư đồng phân đối ảnh khoảng 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn 99%.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng hợp chất có công thức (I) có thể tạo ra tác dụng sinh học mạnh đáng ngạc nhiên đối với các tế bào ung thư đã được biệt hóa cũng như đối với các tế bào ung thư chưa được biệt hóa, được gọi theo cách khác là "tế bào gốc ung thư" hoặc "tế bào tiền thân ung thư". Tác dụng sinh học có thể bao gồm ức chế sự tăng sinh tế bào, gây chết tế bào, gây biệt hóa tế bào và đảo ngược tập tính sai lệch.

Do đó, hợp chất có công thức (I) được dùng để điều trị bệnh ung thư. Cụ thể, hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư trong đó mong muốn nhắm vào cả tế bào ung thư đã biệt hóa và chưa biệt hóa, và trong đó tác dụng đối với cả hai loại tế bào ung thư phải là khác nhau hoặc thậm chí là trái ngược. Ví dụ, hợp chất có công thức (I) có thể gây chế tế bào ở các tế bào ung thư đã biệt hóa và gây biệt hóa tế bào ở các tế bào ung thư chưa biệt hóa. Theo các phương án khác, hợp chất có công thức (I) có thể ức chế sự tăng sinh tế bào gốc ung thư và tế bào gốc ung thư đã biệt hóa, như tế bào ung thư sinh dưỡng.

Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng kết hợp với, hoặc theo cách khác là không có mặt, tác nhân hóa trị liệu khác.

Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư mà kháng với một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu.

Do tác dụng sinh học của chúng đối với các tế bào ung thư chưa biệt hóa, nên hợp chất có công thức (I) được dùng để điều trị bệnh ung thư tái phát ở đối

tượng và để làm giảm tỷ lệ, hoặc nguy cơ tái phát bệnh ung thư ở đối tượng được cho là có nguy cơ tái phát bệnh ung thư, ví dụ, đối tượng ở tình trạng thuyên giảm ung thư. Đối tượng này có thể ở tình trạng thuyên giảm từ khối u rắn như được xác định ở đây. Hợp chất có công thức (I) còn có thể được sử dụng để gây chết tế bào theo chương trình ở, hoặc ức chế quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư. Hợp chất có công thức (I) còn có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư do tế bào gốc ung thư gây ra, như bệnh ung thư. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư di căn.

Ngoài ra, hợp chất có công thức (I) có thể có đặc tính được dung tốt hơn, như cải thiện tình trạng đề kháng với sự kết hợp thông qua glucuronyl transferaza và các transferaza tan trong nước khác như sulfaza, có thể được biểu hiện quá mức đối với các tế bào tăng sinh, như các tế bào ung thư. Thuận lợi là, điều này có thể đem lại đặc tính được tốt hơn, như profin được động học được tăng cường nhờ giảm sự kết hợp và loại bỏ.

Theo tất cả các khía cạnh của sáng chế, bệnh ung thư có thể là khối u rắn, ví dụ như, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi (NSCLC và SCLC), bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư phúc mạc, bệnh ung thư não (bao gồm, ví dụ, u thần kinh đệm như u nguyên bào đệm, u thần kinh đệm cầu não lan tỏa (Diffuse Intrinsic Pontine Glioma-DIPG) và u nguyên bào tủy), bệnh ung thư da, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư đầu và cổ, u melanin, bệnh cổ trướng ác tính, u trung biểu mô hoặc u nguyên bào thần kinh. Bệnh ung thư não có thể là ở người lớn hoặc trẻ em. U thần kinh đệm có thể là đề kháng với temozolomit (TMZ) hoặc nhạy với TMZ.

Theo các phương án cụ thể, bệnh ung thư là bệnh ung thư buồng trứng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư tuyến tiền liệt hoặc bệnh ung thư não (bao gồm, ví dụ, u thần kinh đệm như u nguyên bào đệm, DIPG và u nguyên bào tủy). Theo các phương án khác, bệnh ung thư là bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt hoặc bệnh ung thư não (bao gồm, ví dụ, u thần kinh đệm như u nguyên bào đệm, DIPG và u nguyên bào tủy). Theo các phương án khác, bệnh ung

thư là bệnh ung thư buồng trứng, u thần kinh đệm, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, u melanin hoặc bệnh cổ trướng ác tính. Theo các phương án khác, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư kết trực tràng, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não (bao gồm trẻ em và người lớn), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tử cung, u nguyên bào thần kinh, u trung biểu mô, bệnh cổ trướng ác tính hoặc bệnh ung thư phúc mạc.

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để gây chế tế bào theo chương trình ở, hoặc ức chế quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư buồng trứng. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp để gây chết tế bào theo chương trình ở, hoặc ức chế quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư buồng trứng, phương pháp này bao gồm cho tế bào gốc ung thư buồng trứng tiếp xúc với lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số bất kỳ theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất từ 2, 6, 9, 13 và 36, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, và 13. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 2. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) đồng phân đối ảnh. Tế bào gốc ung thư buồng trứng có thể đề kháng với cisplatin và/hoặc paclitaxel. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng trong màng bụng là.

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư buồng trứng ở đối tượng. Do đó, theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư buồng trứng ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư tái phát. Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 13 và 36, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 2. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối

ảnh. Bệnh ung thư buồng trứng có thể đề kháng với cisplatin và/hoặc paclitaxel. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng trong màng bụng.

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để làm giảm tỷ lệ, hoặc nguy cơ, tái phát bệnh ung thư ở đối tượng được cho là có nguy cơ tái phát bệnh ung thư. Do đó, theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm tỷ lệ, hoặc nguy cơ, tái phát bệnh ung thư ở đối tượng được cho là có nguy cơ tái phát bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I). Đối tượng được cho là có nguy cơ tái phát bệnh ung thư có thể là đối tượng ở tình trạng thuyên giảm khối bệnh ung thư buồng trứng hoặc đối tượng ở tình trạng thuyên giảm khối bệnh ung thư não, như u thần kinh đệm. Phương pháp này có thể bao gồm làm giảm tỷ lệ, hoặc nguy cơ, tái phát bệnh ung thư buồng trứng hoặc tái phát bệnh ung thư não ở đối tượng. Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh dấu theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 2 hoặc hợp chất 9. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để điều trị bệnh ở đối tượng bị mắc bệnh bởi tế bào gốc ung thư buồng trứng. Do đó, theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ở đối tượng bị mắc bệnh bởi tế bào gốc ung thư buồng trứng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Bệnh có thể là bệnh ung thư. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư buồng trứng hoặc một số bệnh ung thư khác, ví dụ, bệnh ung thư di căn. Bệnh ung thư có thể là đề kháng với cisplatin và/hoặc paclitaxel. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng trong màng bụng. Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 2. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để gây chết tế bào theo chương trình ở, hoặc ức chế quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư não, như tế bào gốc u thần kinh đệm. Do đó, theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp ức chế quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư não, như tế bào gốc u thần kinh đệm, phương pháp này bao gồm cho tế bào gốc ung thư não tiếp xúc với lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 36, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6 và 9, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2 và 9. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 9. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Hợp chất có công thức (I) có thể được dùng để điều trị bệnh ở đối tượng bị mắc bệnh bởi tế bào gốc ung thư não, như tế bào gốc u thần kinh đệm. Do đó, theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp để điều trị bệnh ở đối tượng bị mắc bệnh bởi tế bào gốc ung thư não, như tế bào gốc u thần kinh đệm, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Bệnh này có thể là bệnh ung thư. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư não hoặc một số bệnh ung thư khác, ví dụ, bệnh ung thư di căn. Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 36, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6 và 9, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2 và 9. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 9. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư não (như ví dụ, u thần kinh đệm,

DIPG hoặc u nguyên bào tủy), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, u melanin, u nguyên bào thần kinh hoặc bệnh cổ trướng ác tính. Bệnh ung thư não có thể là ở người lớn hoặc trẻ em. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não hoặc u nguyên bào thần kinh. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt hoặc bệnh ung thư não. Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 13 và 36, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư não ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Bệnh ung thư não có thể là u thần kinh đệm, ví dụ, u nguyên bào đệm, DIPG hoặc u nguyên bào tủy. Bệnh ung thư não có thể là ở người lớn hoặc trẻ em. Bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư tái phát. Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 36, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9 và 13, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2 và 9. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 9. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. U thần kinh đệm có thể là đề kháng với TMZ hoặc nhạy với TMZ. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 41, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các

hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 40. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 33 đến 41 hoặc from các hợp chất 33 đến 40. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 33 hoặc 36. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 36. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng trong trực tràng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị u nguyên bào thần kinh ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 41, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 40. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 9 hoặc hợp chất 36. U nguyên bào thần kinh có thể là u nguyên bào thần kinh trẻ em. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị u melanin ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 41, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 40. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 9. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh cổ trướng ác tính ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất có công thức (I). Hợp chất có công thức (I) có thể là hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều hợp chất được đánh số theo sáng chế. Hợp chất có công thức (I) có thể được chọn từ các hợp chất

2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 41, hoặc theo cách khác có thể được chọn từ các hợp chất 2, 6, 9, 19-22, 24 và 32 đến 40. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 2 hoặc hợp chất 9. Hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất 2. Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư phúc mạc, bệnh cổ trướng ác tính, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi hoặc bệnh ung thư tuyến tiền liệt, ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị hợp chất 2. Hợp chất có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư não, u nguyên bào thần kinh, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết trực tràng hoặc bệnh ung thư tuyến tiền liệt, ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị hợp chất 9. Bệnh ung thư não có thể là u thần kinh đệm, ví dụ, DIPG. Hợp chất có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư não, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, u melanin, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư buồng trứng hoặc bệnh ung thư kết trực tràng, ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị hợp chất 36. Bệnh ung thư não có thể là u thần kinh đệm, ví dụ, DIPG. Hợp chất có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung

thư gan ở đối tượng có nhu cầu điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu để điều trị của hợp chất 20 hoặc hợp chất 33. Các hợp chất có thể được sử dụng không có tác nhân hóa trị liệu khác. Các hợp chất có thể ở dạng (+) chất đồng phân đối ảnh.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thừa nhận rằng các hợp chất và dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng đường bất kỳ mà phân phối lượng hữu hiệu của các hợp chất đến mô hoặc vị trí được điều trị. Thông thường, hợp chất và dược phẩm có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, trong tủy sống, dưới da hoặc trong bắp), qua đường miệng hoặc khu trú. Việc sử dụng có thể là toàn thân, một vùng hoặc tại chỗ. Theo một phương án, việc sử dụng có thể qua trực tràng.

Đường sử dụng cụ thể được sử dụng trong trường hợp bất kỳ được đưa ra sẽ tùy thuộc vào một số yếu tố, bao gồm bản chất của bệnh ung thư phải điều trị, mức độ nặng và phạm vi của bệnh ung thư, liều cần thiết của hợp chất cụ thể được phân phối và tác dụng phụ có thể của hợp chất.

Thông thường, dược phẩm thích hợp có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng. Chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược phải là "được chấp nhận" về mặt có thể tương hợp với các thành phần khác của dược phẩm, và không độc với người nhận chúng.

Ví dụ về chất mang hoặc chất pha loãng được dụng là nước khử khoáng hoặc nước cất; dung dịch nước muối; dầu nền thực vật như dầu lạc, dầu rum, dầu ô liu, dầu hạt bông, dầu bắp hoặc dầu dừa; dầu silicon, bao gồm polysiloxan, như methyl polysiloxan, phenyl polysiloxan và methylphenyl polysiloxan; silicon dễ bay hơi; dầu khoáng như parafin lỏng, parafin mềm hoặc squalan; dẫn xuất xenluloza như methyl xenluloza, ethyl xenluloza, carboxymethylxenluloza, natri carboxymethylxenluloza hoặc hydroxypropylmethylxenluloza; Cremaphor; xyclodextrin; alkanol thấp, ví dụ, etanol hoặc *i*-propanol; aralkanol thấp; polyalkylen glycol thấp hoặc alkylen glycol thấp, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol, etylen glycol, propylen glycol, 1,3-butylen glycol hoặc glycerin; este axit béo như isopropyl palmitat, isopropyl

myristat hoặc etyl oleat; polyvinylpyridon; agar; carrageenan; gồm tragacan hoặc gồm acacia và vazolin. Thông thường, chất mang hoặc các chất mang sẽ chiếm từ 10% đến 99,9% trọng lượng của dược phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng thích hợp để sử dụng bằng cách tiêm, ở dạng chế phẩm thích hợp để tiêu hóa qua đường miệng (như viên nang, viên nén, viên nén thôn dài, còn ngọt, ví dụ), ở dạng thuốc mỡ, kem bôi hoặc thuốc bôi thích hợp để sử dụng khu trú, ở dạng thích hợp để phân phối ở dạng thuốc nhỏ mắt, ở dạng sol khí thích hợp để sử dụng bằng cách hít, như bằng cách hít trong mũi hoặc hít qua đường miệng, ở dạng thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, tức là, dưới da, trong bắp hoặc tiêm trong tĩnh mạch.

Để sử dụng làm dung dịch hoặc hỗn dịch để tiêm, chất pha loãng hoặc chất mang không độc được chấp nhận dùng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm xyclodextrin (ví dụ, Captisol®) Cremaphor, dung dịch Ringer, nước muối đẳng trương, nước muối đậm phosphat, etanol và 1,2 propylen glycol. Để hỗ trợ việc tiêm và phân phối, các hợp chất còn có thể được bổ sung vào hạt mỡ hoặc vi hạt được PEGyl hóa và không được PEGyl hóa với đuôi đích xác định được gắn với nhóm PEG, như RGD peptit hoặc glutathion, để hỗ trợ việc đi qua hàng rào não máu.

Một số ví dụ về chất mang, chất pha loãng, tá dược và chất bổ trợ thích hợp để sử dụng qua đường miệng bao gồm xyclodextrin, Cremaphor, dầu lạc, parafin lỏng, natri carboxymetylxenluloza, metylxenluloza, natri alginat, gồm acacia, gồm tragacan, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, gelatin và lexithin. Ngoài các chất này, dược phẩm dùng qua đường miệng có thể chứa chất tạo mùi vị và tạo màu thích hợp. Khi được sử dụng ở dạng viên nang, viên nang có thể được phủ bằng các hợp chất như glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat để làm chậm quá trình gây rã.

Thông thường, tá dược bao gồm chất làm mềm, chất tạo nhũ dịch, chất làm đặc, chất bảo quản, chất diệt khuẩn và chất đệm.

Dạng rắn để sử dụng qua đường miệng có thể chứa chất gắn kết được chấp nhận trong thực hành dược ở người và thú y, chất tạo ngọt, chất gây rã, chất pha loãng, chất tạo mùi vị, chất phủ, chất bảo quản, chất làm trơn và/hoặc chất làm

chậm thời gian. Chất kết dính thích hợp bao gồm gồm acacia, gelatin, tinh bột bắp, gồm tragacan, natri alginat, carboxymetylxenluloza hoặc polyetylen glycol. Chất tạo ngọt thích hợp bao gồm sucroza, lactoza, glucoza, aspartam hoặc sacarin. Chất gây rã thích hợp bao gồm tinh bột bắp, metylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, gồm guar, gồm xanthan bentonit, axit alginic hoặc agar. Chất pha loãng thích hợp bao gồm lactoza, sorbitol, manitol, dextroza, cao lanh, xenluloza, canxi cacbonat, canxi silicat hoặc dicanxi phosphat. Chất tạo mùi vị thích hợp bao gồm dầu bạc hà cay, dầu cây lộc đề, vị anh đào, vị cam hoặc vị mâm xôi. Chất phủ thích hợp bao gồm polyme hoặc copolyme của axit acrylic và/hoặc axit metacrylic và/hoặc các este của chúng, sáp, rượu béo, đạm ngô, senlac hoặc gluten. Chất bảo quản thích hợp bao gồm natri benzoat, vitamin E, alpha-tocopherol, axit ascorbic, metyl paraben, propyl paraben hoặc natri bisulphit. Chất làm trơn thích hợp bao gồm magie stearat, axit stearic, natri oleat, natri clorua hoặc bột talc. Chất làm chậm thời gian thích hợp bao gồm glyxeryl monostearat hoặc glyxeryl distearat.

Dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng có thể chứa, ngoài các chất nêu trên, chất mang lỏng. Chất mang lỏng thích hợp bao gồm nước, dầu như dầu ô liu, dầu lạc, dầu vừng, dầu hướng dương, dầu rum, dầu dừa, parafin lỏng, etylen glycol, propylen glycol, polyetylen glycol, etanol, propanol, isopropanol, glyxerol, rượu béo, triglyxerit hoặc hỗn hợp của chúng.

Hỗn dịch để sử dụng qua đường miệng có thể còn chứa chất gây phân tán và/hoặc chất tạo hỗn dịch. Chất tạo hỗn dịch thích hợp bao gồm natri carboxymetylxenluloza, metylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, natri alginat hoặc rượu axetyl. Chất gây phân tán thích hợp bao gồm lexithin, polyoxyetylen este của axit béo như axit stearic, polyoxyetylen sorbitol mono- hoặc di-oleat, -stearat hoặc -laurat, polyoxyetylen sorbitan mono- hoặc di-oleat, -stearat hoặc -laurat và các chất tương tự.

Nhũ dịch để sử dụng qua đường miệng có thể còn chứa một hoặc nhiều chất nhũ hóa. Chất nhũ hóa thích hợp bao gồm chất gây phân tán như được ví dụ ở trên hoặc gồm tự nhiên như gồm guar, gồm acacia hoặc gồm tragacan.

Phương pháp bào chế được phẩm có thể dùng ngoài đường tiêu hóa là rõ

ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được mô tả chi tiết hơn trong tài liệu, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., hereby incorporated by reference herein.

Dược phẩm khu trú có thể chứa hoạt chất cùng với một hoặc nhiều chất mang được chấp nhận, và tùy ý là thành phần điều trị bất kỳ khác. Dược phẩm thích hợp để sử dụng khu trú bao gồm dược phẩm dạng lỏng hoặc bán lỏng thích hợp để thấm qua da đến vị trí cần điều trị, như dầu xoa bóp, thuốc bôi, kem bôi, thuốc mỡ hoặc miếng thuốc cao, và thuốc nhỏ giọt thích hợp để sử dụng cho mắt, tai hoặc mũi.

Thuốc nhỏ giọt theo sáng chế có thể chứa dung dịch hoặc hỗn dịch chứa dầu hoặc nước vô trùng. Chúng có thể được bào chế bằng cách hòa tan hoạt chất trong dung dịch chứa nước chứa chất diệt khuẩn và/hoặc diệt nấm và/hoặc chất bảo quản thích hợp khác bất kỳ, và tùy ý chứa chất hoạt động bề mặt. Sau đó, dung dịch thu được có thể được làm trong bằng cách lọc, chuyển vào dụng cụ chứa thích hợp và khử trùng. Việc khử trùng có thể được thực hiện bằng cách hấp khử trùng hoặc giữ ở nhiệt độ từ 90°C đến 100°C trong nửa giờ, hoặc bằng cách lọc, tiếp đó chuyển vào dụng cụ chứa bằng kỹ thuật vô trùng. Ví dụ về chất diệt khuẩn và diệt nấm thích hợp để bổ sung vào thuốc nhỏ giọt là phenyl thủy ngân nitrat hoặc axetat (0,002%), benzalkoni clorua (0,01%) và clohexidin axetat (0,01%). Dung môi thích hợp để bào chế dung dịch chứa dầu bao gồm glyxerol, rượu đã được pha loãng và propylen glycol.

Thuốc bôi theo sáng chế bao gồm các chất thích hợp để sử dụng cho da hoặc mắt. Thuốc bôi mắt có thể chứa dung dịch nước vô trùng tùy ý chứa chất diệt khuẩn và có thể được bào chế bằng các phương pháp giống với các phương pháp nêu trên liên quan đến bào chế thuốc nhỏ giọt. Thuốc bôi hoặc dầu xoa bóp để dùng cho da còn có thể chứa chất làm nhanh khô và làm mát da, như rượu hoặc axeton, và/hoặc chất giữ ẩm như glyxerol, hoặc dầu như dầu ô liu.

Kem bôi, thuốc mỡ hoặc cao dán theo sáng chế là dược phẩm dạng bán rắn chứa hoạt chất để sử dụng bên ngoài. Chúng có thể được tạo ra bằng cách trộn hoạt chất ở dạng rời mịn hoặc dạng bột, một mình hoặc trong dung dịch hoặc hỗn dịch

trong chất lỏng chứa nước hoặc không chứa nước, với nền chứa mỡ hoặc không chứa mỡ. Nền này có thể gồm hydrocacbon như parafin cứng, mềm hoặc parafin lỏng, glyxerol, sáp ong, xà phòng kim loại; chất nhầy; dầu có nguồn gốc tự nhiên như dầu hạnh nhân, dầu bắp, dầu lạc, dầu thầu dầu hoặc dầu ô liu; mỡ long cừu hoặc dẫn xuất của nó, hoặc axit béo như axit stearic hoặc axit oleic cùng với rượu, như propylen glycol hoặc macrogol.

Dược phẩm có thể hợp nhất chất hoạt động bề mặt thích hợp bất kỳ như chất hoạt động bề mặt anion, cation hoặc không ion, như sorbitan este hoặc dẫn xuất polyoxyetylen của chúng. Chất tạo hỗn dịch như gôm tự nhiên, dẫn xuất xenluloza hoặc nguyên liệu vô cơ như silic oxit, và các thành phần khác như mỡ long cừu, cũng có thể được bao gồm.

Theo một vài phương án, dược phẩm được sử dụng ở dạng thuốc đạn thích hợp dùng cho trực tràng chứa hợp chất có công thức (I). Các chế phẩm này được bào chế bằng cách trộn hợp chất có công thức (I) với tá dược không gây kích ứng thích hợp là dạng rắn ở nhiệt độ bình thường nhưng là dạng lỏng ở nhiệt độ của trực tràng và do đó sẽ tan chảy trong trực tràng để giải phóng hợp chất có công thức (I). Nguyên liệu như vậy bao gồm bơ cacao, gelatin được glyxerin hóa, dầu thực vật hydro hóa, hỗn hợp của polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau và este axit béo của polyetylen glycol.

Dược phẩm còn có thể được sử dụng hoặc phân phối đến tế bào đích ở dạng hạt mỡ. Hạt mỡ thường thu được từ phospholipit hoặc các chất lipid khác và được tạo ra bởi các tinh thể lỏng hydrat hóa một hoặc nhiều lớp được phân tán trong môi trường chứa nước. Ví dụ cụ thể về hạt mỡ được dùng để sử dụng hoặc phân phối dược phẩm đến tế bào đích là cholesterol tổng hợp (Sigma), phospholipit 1,2-distearoyl-sn-glyxero-3-phosphocholin (DSPC); Avanti Polar Lipids), PEG lipid 3-N-[(*m*-metoxy poly(etylen glycol)2000)carbamoyl]-1,2-dimyrestyloxy-propylamin (PEG-cDMA), và 1,2-di-*o*-octadecenyl-3-(*N,N*-dimetyl)aminopropan (DODMA) lipid cation hoặc 1,2-dilinoleyloxy-3-(*N,N*-dimetyl)aminopropan (DLinDMA) với tỷ lệ mol lần lượt là 55:20:10:15 hoặc 48:20:2:30, PEG-cDMA, DODMA và DLinDMA. Hạt mỡ có thể được tạo ra từ 1,2-distearoyl-*sn*-glyxero-3-

phosphoetanolin-N-[metoxy(polyetylen glycol)-2000] (DSPE PEG2000) và phosphatidylcholin thu được từ đậu nành và được hydro hóa nằm trong khoảng từ 50 đến 100%, ví dụ, Soy PC-75 hoặc Soy PC-100. Khác với MW, PEG's có thể được dùng và được liên kết cộng hóa trị với các chất nhắm đích cụ thể khác nhau như glutathion, RGD peptit hoặc chất nhắm đích hạt mỡ được chấp nhận khác. Lipit không độc, được chấp nhận về mặt sinh lý và có thể chuyển hóa được có khả năng tạo ra hạt mỡ có thể được sử dụng. Dược phẩm ở dạng hạt mỡ có thể chứa chất làm ổn định, chất bảo quản, tá dược và các chất tương tự. Lipit được ưu tiên là phospholipit và phosphatidyl cholin (lexithin), cả dạng tự nhiên và tổng hợp. Các phương pháp để tạo ra hạt mỡ là đã biết trong lĩnh vực này, và liên quan đến điều này, viện dẫn cụ thể được tạo ra đối với: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq.

Dược phẩm còn có thể được sử dụng ở dạng vi hạt hoặc hạt nano. Vi hạt có thể thoái biến sinh học được tạo ra từ polyactit (PLA), polylactit-co-glycolit (PLGA), và epsilon-caprolacton (ε-caprolacton) đã được sử dụng rộng rãi làm chất mang dược chất để làm tăng chu kỳ bán rã huyết tương và do đó kéo dài hiệu lực (R. Kumar, M., 2000, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3(2) 234-258). Vi hạt đã được bào chế để phân phối khoảng ứng cử viên dược chất bao gồm vacxin, thuốc kháng sinh, và ADN. Hơn nữa, các chế phẩm này đã được phát triển cho các đường phân phối khác nhau bao gồm tiêm dưới da ngoài đường tiêu hóa, tiêm trong tĩnh mạch và hít.

Dược phẩm có thể hợp nhất chất nền giải phóng có kiểm soát mà gồm sucroza axetat isobutyrat (sucrose axetat isobutyrate-SAIB) và dung môi hữu cơ hoặc hỗn hợp dung môi hữu cơ. Chất phụ gia polyme có thể được bổ sung vào chất dẫn làm chất cải biến giải phóng để làm tăng thêm độ nhớt và làm chậm tốc độ giải phóng xuống. SAIB là chất phụ gia thực phẩm được biết rõ. Nó rất kỵ nước, là dẫn xuất sucroza được este hóa hoàn toàn, với tỷ lệ rất nhỏ gồm sáu nhóm isobutyrat trên hai nhóm axetat. Làm este hỗn hợp, SAIB không kết tinh nhưng tồn tại ở dạng chất lỏng nhớt trong. Việc trộn SAIB với dung môi hữu cơ được dùng, như etanol hoặc rượu benzylic làm giảm độ nhớt của hỗn hợp đủ để cho phép tiêm. Thành phần dược chất có thể được bổ sung vào chất dẫn phân phối SAIB để tạo ra dung dịch

SAIB hoặc chế phẩm hỗn dịch. Khi chế phẩm này được tiêm dưới da, dung môi khác với chất nền cho phép hỗn hợp SAIB-dược chất hoặc SAIB-dược chất-polyme thiết lập dưới dạng nguồn tạo ra tại chỗ.

Đối với mục đích của sáng chế, hợp chất và dược phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh. Trong ứng dụng điều trị, dược phẩm được sử dụng cho bệnh nhân từng bị bệnh ung thư với lượng đủ để chữa bệnh hoặc ít nhất là ngăn một phần bệnh ung thư và các biến chứng của nó. Dược phẩm sẽ tạo ra lượng hợp chất hoặc chất đủ để điều trị hữu hiệu cho đối tượng.

Lượng hữu hiệu để điều trị cho đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ tùy thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm: bệnh ung thư đang được điều trị và mức độ nặng của chúng; hoạt tính của hợp chất được sử dụng; dược phẩm trong đó hợp chất này có mặt; độ tuổi, thể trọng, sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn của đối tượng; thời gian sử dụng; đường sử dụng; tốc độ cô lập của hợp chất; khoảng thời gian điều trị bệnh; dược chất được sử dụng kết hợp với hoặc trùng khớp với hợp chất, cùng với các yếu tố liên quan khác đã biết rõ trong y học.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể xác định, bằng thử nghiệm thông thường, lượng hữu hiệu không độc của hợp chất mà cần thiết để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư cụ thể.

Thông thường, liều hữu hiệu được mong muốn nằm trong khoảng từ 0,0001mg đến 1000mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; thường là nằm trong khoảng từ 0,001mg đến 750mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 0,01mg đến 500mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 500mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 250mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 1,0mg đến 250mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ. Thông thường hơn, khoảng liều hữu hiệu được mong muốn nằm trong khoảng từ 1,0mg đến 200mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 1,0mg đến 100mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 1,0mg đến 50mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 1,0mg đến 25mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 5,0mg đến 50mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 5,0mg đến

20mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ; nằm trong khoảng từ 5,0mg đến 15mg trên một kg thể trọng trên 24 giờ.

Theo cách khác, liều hữu hiệu có thể lên tới 500mg/m². Thông thường, liều hữu hiệu được mong muốn nằm trong khoảng từ 25 đến 500mg/m², tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25 đến 500mg/m², tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25 đến 350mg/m², tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25 đến 350mg/m², tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25 đến 300mg/m², thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25 đến 250mg/m², thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50 đến 250mg/m², và thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 75 đến 150mg/m².

Thông thường, trong ứng dụng điều trị, việc điều trị sẽ là trong khoảng thời gian có trạng thái bệnh.

Ngoài ra, sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia bình thường trong lĩnh vực này là lượng tối ưu và khoảng cách của các liều riêng lẻ sẽ được xác định bởi bản chất và quy mô của bệnh ung thư đang được điều trị, dạng, đường và vị trí sử dụng, và bản chất của đối tượng cụ thể đang được điều trị. Tương tự, tình trạng tối ưu có thể được xác định bằng các kỹ thuật thông thường.

Hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng mình nó để điều trị bệnh ung thư, hoặc theo cách khác là kết hợp với liệu pháp xạ trị và/hoặc phẫu thuật và/hoặc các chất điều trị khác, ví dụ, tác nhân hóa trị liệu và chất kích thích miễn dịch, là một phần của liệu pháp hỗn hợp. Hợp chất có công thức (I) có thể gây nhạy các tế bào ung thư chưa biệt hóa với tác nhân hóa trị liệu khác và/hoặc liệu pháp xạ trị.

Thuật ngữ "liệu pháp kết hợp" và "liệu pháp phụ" được dự định để bao gồm việc sử dụng chất đa điều trị theo cách liên tiếp trong phác đồ mà sẽ tạo ra tác dụng có lợi và được dự định để bao gồm việc sử dụng các chất này trong chế phẩm duy nhất hoặc trong các chế phẩm riêng biệt.

Liệu pháp kết hợp có thể bao gồm các hoạt chất được sử dụng cùng nhau, lần lượt, hoặc cách nhau nếu thích hợp trong mỗi trường hợp. Việc kết hợp các hoạt chất bao gồm các hợp chất theo sáng chế có thể là hiệp đồng.

Việc cùng sử dụng hợp chất có công thức (I) với (các) chất điều trị khác có

thể được thực hiện bởi hợp chất có công thức (I) ở trong cùng một dạng liều đơn vị ở dạng (các) chất điều trị khác, hoặc hợp chất có công thức (I) và (các) chất điều trị khác có thể có mặt ở dạng liều đơn vị riêng lẻ và rời mà được sử dụng lần lượt, cùng một lúc, hoặc cùng thời điểm. Việc sử dụng lần lượt có thể là theo thứ tự bất kỳ nếu cần, và có thể cần tác dụng sinh lý đang xảy ra của chất thứ nhất hoặc chất ban đầu là hiện tại khi chất thứ hai hoặc chất sau cùng được sử dụng, đặc biệt là khi tác dụng tích lũy hoặc hiệp đồng được mong muốn. Khi được sử dụng riêng biệt, có thể ưu tiên đối hợp chất có công thức (I) và chất khác được sử dụng bằng cùng một đường sử dụng, mặc dù không cần thiết phải như vậy.

Theo các phương án khác nhau của sáng chế, một hoặc nhiều hợp chất có công thức (I) có thể được bao gồm trong liệu pháp kết hợp với phẫu thuật và/hoặc liệu pháp xạ trị và/hoặc một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu.

Có nhiều tác nhân hóa trị liệu được sử dụng hiện nay, trong đánh giá lâm sàng và trong phát triển tiền lâm sàng, mà có thể được chọn để điều trị bệnh ung thư kết hợp với hợp chất có công thức (I). Các chất này nằm trong một vài danh mục chính, cụ thể là, chất thuốc loại thuốc kháng sinh, chất alkyl hóa, chất chống chuyển hóa, chất hormon, chất miễn dịch, chất thuộc loại interferon và danh mục các chất hỗn hợp. Theo cách khác, tác nhân hóa trị liệu khác, như chất ức chế proteaza cơ chất kim loại (metallomatrix proteases-MMP) có thể được sử dụng. Các chất thích hợp có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp bao gồm các chất được liệt kê, ví dụ, trong tài liệu: Merck Index, *An Encyclopaedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 12th Ed., 1996.

Khi được sử dụng để điều trị khối u rắn, hợp chất có công thức (I) có thể được sử dụng với một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu sau: adriamycin, taxol, docetaxel, fluoracil, melphalan, cisplatin, alpha interferon, COMP (xyclophosphamid, vincristin, metotrexat và prednison), etoposide, mBACOD (metotrexat, bleomycin, doxorubicin, xyclophosphamid, vincristin và dexametason), PROMACE/MOPP (prednison, metotrexat (w/leucovorin rescue), doxorubicin, xyclophosphamid, taxol, etoposide/mecloetamin, vincristin, prednison và procarbazine), vincristin, vinblastin, angiostatin, TNP 470, pentosan polysulfat, yếu

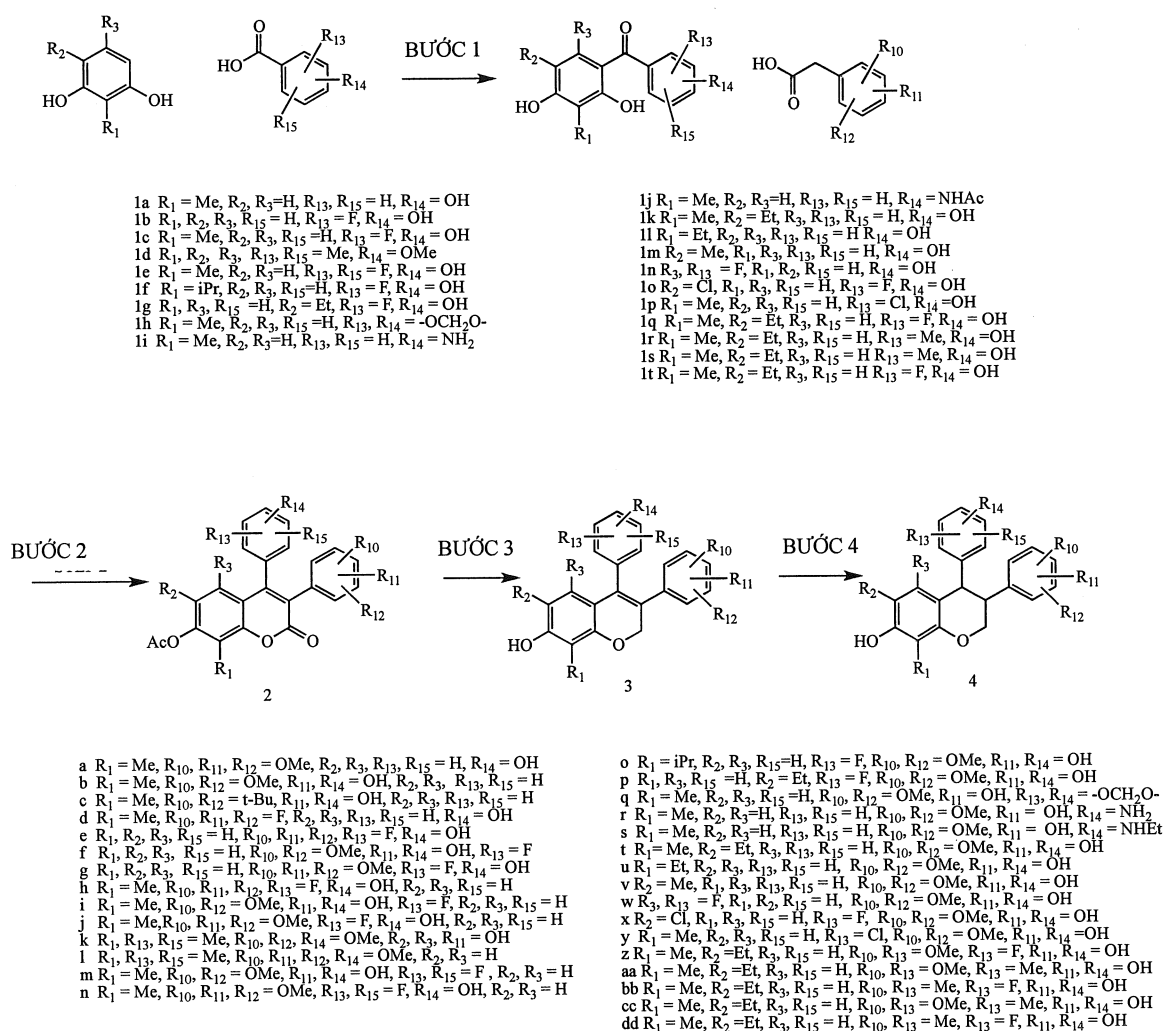
tổ tiểu huyết cầu 4, angiostatin, LM 609, SU 101, CM 101, Techgalan, thalidomide, SP-PG và các chất tương tự.

Sáng chế còn được mô tả dưới đây có dựa vào các ví dụ không giới hạn sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Điều chế hợp chất có công thức (I)

Hợp chất có công thức (I) đại diện được điều chế như sau.



Bước 1. ZnCl_2 , POCl_3 , 70 °C, 2h; Bước 2. DiPEA, Ac_2O , 135°C, 18h. Bước 3. THF, $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ trong THF, 35°C, 18h; Bước 4. H_2 , Pd/C, EtOH, 3bar (1bar=100kPa), 40°C, 18h.

Bước 1. (2,4-dihydroxy-3-metylphenyl) (4-hydroxyphenyl)metanon (1-1a)

2-metylresorcinol (50g, 1 đương lượng), axit 4-hydroxybenzoic (55,5g, 1 đương lượng), kẽm clorua (120g, 2,2 đương lượng) và POCl_3 (550mL) được bổ

sung vào bình trong điều kiện N₂ và khuấy. Hỗn hợp này được đun nóng đến 70°C trong 2 giờ, làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và rót lên đá/nước (4L) giữ nhiệt độ <30°C. Chất rắn được lọc, rửa bằng nước (3 lần x 500mL). Sau đó, chất rắn ẩm được tái kết tinh từ IMS (250mL) và làm khô để tạo ra sản phẩm là chất rắn màu cam 85g (87%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,91 (s, 1H), 10,59 (s, 1H), 10,30 (s, 1H), 7,28 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,18 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 6,46 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 6,24 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 2,02 (s, 3H).

Các hợp chất tương tự khác được điều chế bằng phương pháp này:

(2,4-Dihydroxyphenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1b**) (47%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,90 (bs, 1H), 7,51-7,32 (m, 3H), 7,09 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,45-6,33 (m, 2H).

(2,4-Dihydroxy-3-metylphenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1c**) (41%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,72 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 10,65 (s, 1H), 7,43 (dd, *J* = 1,96, 11,74 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 9,00 Hz, 2H), 7,06 (t, *J* = 8,41 Hz, 1H), 6,45 (d, *J* = 9,00 Hz, 1H), 1,99 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-3-metylphenyl) (4-metoxi-3,5-dimetylphenyl)metanon (**1-1d**) (63%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,89 (s, 1H), 10,67 (s, 1H), 10,15 (s, 1H), 7,38-7,15 (m, 3H), 6,52-6,43 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,28 (s, 6H).

(3,5-Diflo-4-hydroxyphenyl)(2,4-dihydroxy-3-metylphenyl)metanon (**1-1e**) (43%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,61 (s, 1H), 10,84 (bs, 1H), 9,70 (bs, 1H), 7,23-7,10 (m, 2H), 6,98-6,85 (m, 1H), 2,20 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-3-i-propylphenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1f**) (18%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,88 (bs, 1H), 7,62 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 6,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 1,95 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,2 (t, *J* = 9,1Hz, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-etylphenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1g**) (77%) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,41 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,22 (dd, *J* = 1,2, 8,2 Hz), 7,08 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 2,51 (q, *J* = 9,1 Hz, 2H), 1,22 (t, *J* = 9,2 Hz, 3H).

(2,4-Dihydroxy-3-methylphenyl)(3-4-metylendioxyphenyl)metanon (**1-1h**) (22%) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,65 (br s, 1H), 9,87 (br s, 1H), 7,38 (d, $J = 8,2\text{Hz}$, 1H), 7,25 (m, 2H), 7,05 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 1H), 6,43 (d, $J = 8,2\text{Hz}$, 1H), 6,06 (s, 2H), 2,02 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-3-methylphenyl)(4-nitrophenyl)metanon (**1-1i**) (38%) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,96 (br s, 1H), 8,33 (d, $J = 8,7\text{ Hz}$, 2H), 7,97 (d, $J = 8,8\text{ Hz}$, 2H), 7,09 (d, $J = 8,12\text{ Hz}$, 1H), 6,90 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 1H), 2,05 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-3-methylphenyl)(4-axetamidephenyl)metanon (**1-1j**) (38%) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,21 (br s, 1H), 9,66 (br s, 1H), 7,88 (d, $J = 8,1\text{ Hz}$, 2H), 7,44 (d, $J = 8,4\text{ Hz}$, 1H), 6,56 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 1H), 6,50 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 2H), 6,10 (s, 1H), 2,09 (s, 3H), 2,02 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-etyl-3-methylphenyl)(4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1k**) (42%) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,55 (s, 1H), 11,20 (br, 1H), 10,90 (br, 1H), 7,44 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,99 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 2H), 3,45 (q, $J = 7,9\text{ Hz}$, 2H), 2,2 (s, 3H), 1,34 (t, $J = 8,0\text{ Hz}$, 3H).

(2,4-Dihydroxy-3-etylphenyl)(4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1l**) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,2 (s, 1H), 7,43 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 1H), 7,35 (d, $J = 8,4\text{ Hz}$, 2H), 7,11 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 1H), 6,55 (d, $J = 8,4\text{Hz}$, 2H), 2,65 (m, 2H), 1,04 (t, $J = 7,8\text{ Hz}$, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-methylphenyl)(4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1m**) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,90 (s, 1H), 10,90-95 (br, 2H), 7,40 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 2H), 7,33 (s, 1H), 7,11 (d, $J = 8,3\text{ Hz}$, 2H), 6,33 (s, 1H), 2,05 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-flophenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1n**) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,99 (m, 1H), 7,55-7,35 (m, 3H), 7,05 (m, 1H), 6,55 (s, 1H).

(5-clo-2,4-Dihydroxyphenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (**1-1o**) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,11 (s, 1H), 7,89 (m, 1H), 7,55-45 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,5 (s, 1H).

(2,4-Dihydroxy-3-methylphenyl)(3-clo-4-hydroxyphenyl)metanon (1-1p)¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,91 (s, 1H), 11,11 (br, 1H), 10,65 (br, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,36 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,11 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,23 (d, *J* = 8,2Hz, 1H) 2,05 (s, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-etyl-3-metylphenyl)(3-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (1-1q) (42%) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,55 (s, 1H), 11,20 (br, 1H), 10,90 (br, 1H), 7,55-7,45 (m, 2H), 7,11 (brs, 1H), 7,01 (s, 1H), 3,45 (q, *J* = 7,9 Hz, 2H), 2,2 (s, 3H), 1,34 (t, *J* = 8,0 Hz, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-etyl-3-metylphenyl)(3-metyl-4-hydroxyphenyl)metanon (1-1r) (41%) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,55 (s, 1H), 8,20 (br, 1H), 7,90 (br, 1H), 6,65 (d, *J* = 7,1Hz, 1H), 6,60 (dd, *J* = 7,1, 2,1 Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,35 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 3,15 (q, *J* = 7,9 Hz, 2H), 2,2 (s, 3H), 1,14 (t, *J* = 8,0 Hz, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-etyl-3-metylphenyl)(2-metyl-4-hydroxyphenyl)metanon (1-1s) (32%) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,59 (s, 1H), 8,60 (br, 1H), 7,95 (br, 1H), 6,68 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,56 (d, *J* = 7,Hz, 1H), 6,35 (dd, *J* = 6,9, 2,1 Hz, 1H), 3,25 (q, *J* = 7,8 Hz, 2H), 2,2 (s, 3H), 1,24 (t, *J* = 8,0 Hz, 3H).

(2,4-Dihydroxy-5-etyl-3-metylphenyl)(2-flo-4-hydroxyphenyl)metanon (1-1t) (38%) ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10,9 (s, 1H), 9,16 (br, 1H), 7,95 (br, 1H), 6,78 (dd *J* = 6,9, 6,2 Hz, 1H), 6,62 (brd, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,56 (s, 1H), 6,45 (brd, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,28 (q, *J* = 7,8 Hz, 2H), 2,2 (s, 3H), 1,14 (t, *J* = 8,0 Hz, 3H).

Bước 2. 3-(4-Axetoxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-8-metyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (1-2a)

Cho (2,4-dihydroxy-3-metylphenyl) (4-hydroxyphenyl)metanon (36,8g, 1 đương lượng) và axit 3,5-dimetoxy-4-hydroxyphenylaxetic (32g, 1 đương lượng), được vào anhydrit axetic (110mL), có khuấy, sau đó diisopropyletylamin (64,4g, 4,5 đương lượng) được bổ sung vào trong 5 phút. Phản ứng này được đun nóng đến 130-140°C trong 18 giờ, sau đó làm nguội đến nhiệt độ trong phng và rót lên trên nước (750mL). Dung dịch chứa nước này được chiết bằng DCM (2 lần x 750mL), rửa bằng nước (500mL), nước muối (300mL), làm khô bằng MgSO₄, sau đó được giải hấp để tạo ra chất rắn nhớt màu nâu sẫm. Nguyên liệu thô được xử lý bằng

EtOAc (200mL), khuấy, đun nóng đến hồi lưu và làm nguội, chất rắn được lọc hết, rửa bằng EtOAc lạnh (50mL) để tạo ra chất rắn màu vàng nhạt (66 g). Chất rắn này được xử lý 2 x EtOAc (100mL), khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, lọc để tạo ra chất rắn màu trắng (62g, 76%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,18-7,07 (m, 5H), 6,93 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,37 (s, 2H), 3,62 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,28 (s, 3H).

Các hợp chất khác được điều chế bằng phương pháp này:

4-(7-Axetoxy-8-metyl-2-oxo-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2H-cromen-4-yl)phenyl axetat (**1-2b**) (61%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,17-7,06 (m, 5H), 6,91 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,34 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,65 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,30 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-di-*tert*-butylphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-8-metyl-2-oxo-2H-cromen-7-yl axetat (**1-2c**) (21%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,20-7,00 (m, 7H), 6,94-6,86 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,09 (s, 9H).

4-(7-Axetoxy-8-metyl-2-oxo-3-(3,4,5-triflophenyl)-2H-cromen-4-yl)phenyl axetat (**1-2d**) (20%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,18-7,08 (m, 5H), 7,01 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,80-6,71 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,33 (s, 3H).

4-(7-Axetoxy-2-oxo-3-(3,4,5-triflophenyl)-2H-cromen-4-yl)-2-flophenyl axetat (**1-2e**) (76%). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,57-7,29 (m, 4H), 7,21-7,10 (m, 4H), 2,31 (s, 6H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-3-flophenyl)-2-oxo-2H-cromen-7-yl axetat (**1-2f**) (68%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,31-7,20 (m, 2H), 7,17-7,10 (m, 1H), 7,07-6,98 (m, 2H), 6,94-6,88 (m, 1H), 6,38 (s, 2H), 3,64 (s, 6H), 2,36 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,29 (s, 3H).

4-(7-Axetoxy-2-oxo-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2H-cromen-4-yl)-2-flophenyl axetat (**1-2g**) (50%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,32-7,22 (m, 2H), 7,18-7,05 (m, 1H), 7,08-6,90 (m, 3H), 6,33 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,69 (s, 6H), 2,38 (s, 6H).

4-(4-Axetoxy-3-flophenyl)-8-metyl-2-oxo-3-(3,4,5-triflophenyl)-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2h**) (49%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,37-7,05 (m, 4H), 7,03-6,88 (m, 2H), 6,81-6,70 (m, 1H), 6,38 (s, 1H), 2,36 (bs, 9H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-3-flophenyl)-8-metyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2i**) (46%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,18-6,87 (m, 5H), 6,39 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 2,29 (s, 3H).

4-(4-Axetoxy-3-flophenyl)-8-metyl-2-oxo-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2j**) (49%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,16-6,89 (m, 5H), 6,34 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,68 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,31 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-metoxy-3,5-dimetylphenyl)-8-metyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2k**) (30%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,20 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,77 (s, 2H), 6,42 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,61 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,20 (s, 6H).

4-(4-Metoxy-3,5-dimetylphenyl)-8-metyl-2-oxo-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2l**) (34%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,15 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,76 (s, 2H), 6,38 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 3,66 (s, 6H), 2,39 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,20 (s, 6H).

4-(4-Axetoxy-3,5-diflophenyl)-3-(4-axetoxy-3,5-dimetoxyphenyl)-8-metyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2m**) (30%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,03-6,90 (m, 3H), 6,84-6,76 (m, 1H), 6,47 (s, 2H), 3,73 (s, 6H), 2,39 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,28 (s, 3H).

4-(4-Axetoxy-3,5-diflophenyl)-8-metyl-2-oxo-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2n**) (22%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,03-6,77 (m, 4H), 6,40 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,71 (s, 6H), 2,38 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,34 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(3-flo-4-axetoxyphenyl)-8-propyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2o**) (34%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,18 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,15-09 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,82 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H),

6,36 (s, 2H), 3,73 (s, 6H), 2,75 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 1,06 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(3-fluoro-4-axetoxyphenyl)-6-ethyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2p**) (34%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,18 (s, 1H), 7,16 (m, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,04 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H), 6,95 (dd, $J = 8,3, 2,5$ Hz, 1H), 6,35 (s, 2H), 3,56 (s, 6H), 2,56 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,12 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 1,04 (t, $J = 7,7$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2q**) (75%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,20 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,56 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,51 (s, 1H), 6,34 (s, 2H), 5,96 (s, 1H), 5,91 (s, 1H), 3,58 (s, 6H), 2,25 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 1,65 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-nitrophenyl)-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2r**) (25%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,25 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,35 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,96 (m, 2H), 6,34 (s, 2H), 3,67 (s, 6H), 2,25 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,89 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-ethylaminophenyl)-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2s**) (45%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,51 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,43 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,42 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 1,96 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-6-ethyl-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2t**) (25%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,18 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 6,96 (s, 1H), 6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,35 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,32 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,05 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-8-ethyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2u**) (45%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,21 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,10 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,91 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,41 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,81 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 1,25 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2v**) (55%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,18 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,07 (m, 1H), 6,88 (m, 1H), 6,34 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,28 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 1,96 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-3-flophenyl)-5-flo-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2w**) (15%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,07-7,02 (m, 2H), 6,96-86 (m, 1H), 6,58 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 6,36 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,23 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,18 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-6-clo-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2x**) (45%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (m, 2H), 7,18 (dd, *J* = 1,4, 1,2 Hz, 1H), 7,02 (dd, *J* = 1,2, 8,1 Hz, 1H), 6,96 (dd, *J* = 1,3, 8,6 Hz, 1H), 6,41 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,45 (s, 3H), 2,35 (s, 3H), 2,21 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-3-chlorophenyl)-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2y**) (55%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,31 (s, 1H), 7,10 (m, 2H), 7,05-7,01 (m, 2H), 6,45 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 2,35 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,18 (s, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-3-flophenyl)-6-etyl-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2z**) (35%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,07-7,02 (m, 2H), 6,96-88 (m, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,35 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,32 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,05 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-3-metylphenyl)-6-etyl-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2aa**) (38%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6,68 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,65 (dd, *J* = 7,1, 2,1 Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,35 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 5,98 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,38 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,05 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimetylphenyl)-4-(4-axetoxy-3-metylphenyl)-6-etyl-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2bb**) (38%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6,68 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,65 (dd, *J* = 7,1, 2,1 Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,35 (d, *J* =

2,1 Hz, 1H), 6,23 (s, 2H), 2,31 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,11 (s, 6H), 1,98 (s, 3H), 1,15 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxy-2-methylphenyl)-6-ethyl-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2cc**) (36%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,68 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,46 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 6,30 (dd, $J = 6,9$, 2,1 Hz, 1H), 5,92 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 2,33 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,2 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,15 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethylphenyl)-4-(4-axetoxy-2-flophenyl)-6-ethyl-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-2dd**) (38%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,88 (dd $J = 6,9$, 6,5 Hz, 1H), 6,66 (brd, $J = 7,0$ Hz, 1H), 6,56 (s, 1H), 6,45 (brd, $J = 6,5$ Hz, 1H), 2,31 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,12 (s, 6H), 1,95 (s, 3H), 1,17 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

Bước 3. 3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-8-methyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3a**)

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-axetoxyphenyl)-8-methyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (24g, 1 đương lượng), và THF (1500mL) được bổ sung vào bình dưới N_2 và làm lạnh đến 5°C . Phức boran dimethyl sulfua 2M trong THF (400mL, 18 đương lượng) được bổ sung vào trong 10 phút. Dung dịch này được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ này, sau đó đun nóng đến 40°C . Hỗn hợp này được rót lên trên HCl 2M (2000mL) ở nhiệt độ $< 15^\circ\text{C}$, sau đó chiết bằng EtOAc (2 lần x 1000mL). Các chất hữu cơ thu gom được rửa bằng nước (2 lần x 1000mL), nước muối, làm khô (MgSO_4) sau đó giải hấp đến khô tạo ra hợp chất thô (**1-3a**) là chất rắn nhớt màu vàng. Nguyên liệu này được tinh chế bằng sắc ký cột, tách rửa với heptan trên heptane/EtOAc 3:2, Phân đoạn sản phẩm được giải hấp để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục này (9,5g, 53%) là chất rắn màu cam. ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,39 (bs, 2H), 7,14 (s, 1H), 6,98 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,82 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,54 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,40 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,35 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 3,61 (s, 6H), 2,12 (s, 3H).

Các hợp chất tương tự khác được điều chế bằng phương pháp này:

4-(4-Hydroxyphenyl)-8-methyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3b**) (47%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,38 (bs, 2H), 6,98 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,81 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,53 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,43-6,35 (m, 3H), 5,08 (s, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,61 (s, 6H), 2,22 (s, 3H).

3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-8-methyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3c**) (36%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,36-8,29 (m, 2H), 7,50-7,42 (m, 1H), 6,94-6,77 (m, 5H), 6,52 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,39 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,97 (s, 1H), 5,09 (s, 2H), 2,13 (s, 3H), 1,51 (s, 9H), 1,30 (s, 9H).

4-(4-Hydroxyphenyl)-8-methyl-3-(3,4,5-triflophenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3d**) (41%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,52 (bs, 1H), 8,50 (bs, 1H), 6,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,90-6,80 (m, 4H), 6,54 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,47 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,05 (s, 2H), 2,12 (s, 3H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-triflophenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3e**) (34%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,80 (bs, 1H), 8,66 (bs, 1H), 7,05-6,77 (m, 5H), 6,74-6,66 (m, 1H), 6,45-6,34 (m, 2H), 5,03 (s, 2H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3f**) (44 %). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,72 (bs, 1H), 8,57 (bs, 1H), 7,20 (bs, 1H), 7,06-6,96 (m, 1H), 6,91-6,80 (m, 2H), 6,81-6,75 (m, 1H), 6,45-6,37 (m, 4H), 5,08 (s, 2H), 3,63 (s, 6H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3g**) (48%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,74 (bs, 1H), 8,59 (bs, 1H), 7,04-6,80 (m, 3H), 6,84-6,82 (m, 1H), 6,48-6,37 (m, 4H), 5,08 (s, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,62 (s, 6H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-8-methyl-3-(3,4,5-triflophenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3h**) (48%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,80 (bs, 1H), 8,57 (bs, 1H), 7,04-6,75 (m, 5H), 6,54 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,43 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,06 (s, 2H), 2,12 (s, 3H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-methyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3i**) (53%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,66 (bs, 1H), 8,37

(bs, 1H), 7,19 (bs, 1H), 7,06-6,76 (m, 3H), 6,53 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,45-6,35 (m, 3H), 5,07 (s, 2H), 3,63 (s, 6H), 2,17 (s, 3H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3j**) (49%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,68 (bs, 1H), 8,49 (bs, 1H), 7,04-6,77 (m, 3H), 6,53 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,48-6,36 (m, 3H), 5,07 (s, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,65 (s, 6H), 2,13 (s, 3H).

3-(4-Hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-metoxy-3,5-dimetylphenyl)-8-metyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3k**) (22%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,37 (bs, 1H), 7,21 (bs, 1H), 6,32 (s, 2H), 6,49-6,34 (m, 4H), 5,08 (s, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,60 (s, 6H), 2,22 (s, 6H), 2,13 (s, 3H).

4-(4-Metoxy-3,5-dimetylphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3l**) (15%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,41 (bs, 1H), 6,81 (s, 2H), 6,49-6,36 (m, 4H), 5,08 (s, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 3,61 (s, 6H), 2,22 (s, 6H), 2,12 (s, 3H).

4-(3,5-Diflo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-8-metyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3m**) (47%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,86-6,74 (m, 2H), 6,47-6,36 (m, 4H), 5,10 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 2,13 (s, 3H).

4-(3,5-Diflo-4-hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3n**) (55%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,86-6,75 (m, 2H), 6,49-6,37 (m, 4H), 5,12 (s, 2H), 3,66 (s, 9H), 2,14 (s, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-8-propyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3o**) (36%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,72 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,01 (m, 1H), 6,95-78 (m, 2H), 6,48 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 6,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 6,41 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 3,71 (s, 6H), 2,65 (m, 1H), 1,65 (m, 1H), 1,06 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3p**) (54%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,54 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,05 (m, 1H), 6,78 (m, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,34 (s, 2H), 5,04 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 2,45 (m, 2H), 1,06 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-8-methyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3q**) (54%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,23 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,82 (d, *J* = 8,01 Hz, 1H), 6,66 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,50 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,42 (s, 2H), 6,40 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,04 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 3,57 (s, 6H), 1,78 (s, 3H).

3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-nitrophenyl)-8-methyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3r**) (24%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,23 (s, 1H), 8,23 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,25 (s, 1H), 6,38 (s, 2H), 6,32 (s, 2H), 5,04 (s, 2H), 3,56 (s, 6H), 2,01 (s, 3H).

3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4-(4-ethylaminophenyl)-8-methyl-2*H*-cromen-7-ol (**1-3s**) (21%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,23 (s, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,66 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,34 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,34 (s, 2H), 5,04 (s, 2H), 3,45 (s, 6H), 3,05 (m, 2H), 1,06 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).

4-(4-hydroxyphenyl)-6-ethyl-8-methyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3t**) (31%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,67 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,05 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,65 (s, 1H), 6,45 (s, 2H), 5,08 (s, 2H), 3,56 (s, 6H), 2,55 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 1,07 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

4-(4-hydroxyphenyl)-8-ethyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3u**) (61%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,34 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,01 (m, 2H), 6,76 (m, 2H), 6,56 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,50 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,45 (s, 2H), 5,10 (s, 2H), 3,47 (s, 6H), 2,65 (m, 2H), 1,06 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

4-(4-hydroxyphenyl)-6-methyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3v**) (68%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,88 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,33 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 7,05 (m, 2H), 6,78 (m, 2H), 6,65 (s, 1H), 6,34 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 3,56 (s, 6H), 2,07 (s, 3H).

4-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-5-fluoro-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2*H*-cromen-7-ol (**1-3w**) (21%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,12 (s, 1H), 7,23 (s,

1H), 6,88-76 (m, 3H), 6,50 (s, 1H), 6,45 (s, 2H), 6,05 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 4,89 (s, 2H), 3,56 (s, 6H).

6-clo-4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-trimetoxyphenyl)-2H-cromen-7-ol (**1-3x**) (21%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 7,32 (m, 1H), 7,16-09 (m, 2H), 6,94 (s, 1H), 6,59 (s, 1H), 6,39 (s, 2H), 5,10 (s, 2H), 3,65 (s, 6H).

4-(3-clo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-8-metyl-2H-cromen-7-ol (**1-3y**) (41%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 7,11 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,88 (dd, $J = 1,2, 8,2$ Hz, 1H), 6,55 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,42 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 2,05 (s, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-8-metyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-2H-cromen-7-ol (**1-3z**) (41%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,77 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,15 (m, 2H), 6,98 (brs, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,45 (s, 2H), 5,08 (s, 2H), 3,56 (s, 6H), 2,55 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 1,07 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

4-(3-metyl-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-8-metyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-2H-cromen-7-ol (**1-3aa**) (38%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,22 (br, 2H), 7,66 (s, 1H), 6,62 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,55 (dd, $J = 7,1, 2,3$ Hz, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,38 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 5,95 (s, 2H), 3,51 (s, 6H), 2,32 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 1,92 (s, 3H), 1,05 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-8-metyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-2H-cromen-7-ol (**1-3bb**) (38%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,65 (dd, $J = 7,1, 2,1$ Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,35 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 6,23 (s, 2H), 2,31 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,11 (s, 6H), 1,98 (s, 3H), 1,15 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimetylphenyl)-4-(4-axetoxy-3-metylphenyl)-6-etyl-8-metyl-2-oxo-2H-cromen-7-yl axetat (**1-3cc**) (36%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,68 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,46 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 6,30 (dd, $J = 6,9, 2,1$ Hz, 1H), 5,92 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 2,33 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,2 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,15 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

3-(4-Axetoxy-3,5-dimethylphenyl)-4-(4-axetoxy-2-flophenyl)-6-etyl-8-metyl-2-oxo-2*H*-cromen-7-yl axetat (**1-3dd**) (38%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,08 (br 1H), 8,65 (s, 1H), 8,22 (br 1H), 6,81 (dd *J* = 6,6, 6,3 Hz, 1H), 6,62 (brd, *J* = 7,0 Hz, 1H), 6,46 (s, 1H), 6,35 (brd, *J* = 6,5 Hz, 1H), 2,31 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,12 (s, 6H), 1,95 (s, 3H), 1,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

Bước 4, 3-(4-Hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 2) (**1-4a**)

3-(4-Hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-8-metyl-2*H*-cromen-7-ol (4,8g, 1 đương lượng), IMS (500mL) và Pd/C 10 % bột nhão loại 338 (3,0 g) được bổ sung vào thiết bị hydro hóa và nạp đầy H₂ 2,5bar (1bar=100kPa). Phản ứng này được để ở 40°C qua đêm và thể hiện sự chuyển hóa hoàn toàn. Chất xúc tác được lọc hết và nước lọc được giải hấp đến khô. Ba mẻ bằng nhau được trộn và làm khô để tạo ra 12,6 g (88%) hợp chất có công thức 2 là chất rắn màu trắng nhờ. ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 6,65-6,51 (m, 5H), 6,40 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,04 (s, 2H), 4,44-4,35 (m, 1H), 4,25-4,15 (m, 2H), 3,64 (s, 6H), 3,46-3,37 (m, 1H), 2,15 (s, 3H).

Hợp chất có công thức (I) khác được điều chế bằng phương pháp này:

4-(4-Hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 1) (**1-4b**) (99%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 6,63-6,49 (m, 5H), 6,36 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,04 (s, 2H), 4,46-4,36 (m, 1H), 4,25-4,17 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,63 (s, 6H), 3,49-3,40 (m, 1H), 2,15 (s, 3H).

3-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 3) (**1-4c**) (33%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 8,10 (bs 1H), 8,05 (bs, 1H) 7,28-7,20 (m, 1H), 6,63-6,52 (m, 3H), 6,43-6,36 (m, 2H), 6,04 (s, 2H), 4,47-4,35 (m, 1H), 4,24-4,09 (m, 2H), 3,64 (s, 6H), 3,78-3,66 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

4-(4-Hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-triflophenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 4) (**1-4d**) (95%). ¹H NMR (300 MHz, Axeton-d₆) δ 6,67-6,52 (m, 7H), 6,42 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,48-4,40 (m, 1H), 4,35-4,26 (m, 2H), 3,64-3,55 (m, 1H), 2,15 (s, 3H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-triflophenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 5) (**1-4e**) (50%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,84-6,65 (m, 4H), 6,49-6,30 (m, 4H), 4,48-4,18 (m, 3H), 3,67-3,56 (m, 1H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 6) (**1-4f**) (39%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,80-6,74 (m, 2H), 6,44-6,32 (m, 4H), 6,08 (s, 2H), 4,41-4,33 (m, 1H), 4,24-4,12 (m, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,52-3,38 (m, 1H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 7) (**1-4g**) (22%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,80-6,72 (m, 2H), 6,48-6,33 (m, 4H), 6,11 (s, 2H), 4,44-4,35 (m, 1H), 4,25-4,14 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,64 (s, 6H), 3,52-3,45 (m, 1H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-triflophenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 8) (**1-4h**) (50%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,81-6,65 (m, 3H), 6,60 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,49-6,40 (m, 2H), 6,39-6,30 (m, 1H), 4,50-4,42 (m, 1H), 4,38-4,30 (m, 2H), 3,66-3,55 (m, 1H), 2,16 (s, 3H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 9) (**1-4i**) (60%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,78-6,70 (m, 1H), 6,60 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,46-6,32 (m, 3H), 6,07 (s, 2H), 4,45-4,35 (m, 1H), 4,28-4,17 (m, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,49-3,41 (m, 1H), 2,20 (s, 3H).

4-(3-Flo-4-hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxyphenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 10) (**1-4j**) (44%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,80-6,71 (m, 1H), 6,60 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,46-6,32 (m, 4H), 6,10 (s, 2H), 4,48-4,38 (m, 1H), 4,31-4,22 (m, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,65 (s, 6H), 3,53-3,41 (m, 1H), 2,17 (s, 3H).

3-(4-Hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-4-(4-metoxy-3,5-dimetylphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 11) (**1-4k**) (83%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6,52 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,33 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,25 (s, 2H), 5,91 (s, 2H), 4,34-4,24 (m, 1H), 4,18-4,05 (m, 2H), 3,57 (s, 3H), 3,50 (s, 6H), 3,48-3,33 (m, 1H), 2,05 (s, 3H), 2,03 (s, 6H).

4-(4-Metoxo-3,5-dimetylphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxiphenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 12) (**1-4l**) (99%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,58 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,42 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,33 (s, 2H), 6,05 (s, 2H), 4,52-4,37 (m, 1H), 4,25-4,12 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,11 (s, 6H), 3,50-3,39 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 2,07 (s, 6H).

4-(2,3-Diflo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxiphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 13) (**1-4m**) (60%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,73-6,68 (m, 1H), 6,64-6,57 (m, 1H), 6,55-6,49 (m, 1H), 6,42 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 6,08 (s, 2H), 4,59-4,55 (m, 1H), 4,46-4,36 (m, 1H), 4,25-4,21 (m, 1H), 3,63 (s, 6H), 3,53-3,47 (m, 1H), 2,14 (s, 3H).

4-(2,3-Diflo-4-hydroxyphenyl)-8-metyl-3-(3,4,5-trimetoxiphenyl)chroman-7-ol (Hợp chất 14) (**1-4n**) (66%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,74-6,68 (m, 1H), 6,60 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 6,55-6,47 (m, 1H), 6,44 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 6,13 (s, 2H), 4,61-4,57 (m, 1H), 4,48-4,36 (m, 1H), 4,29-4,22 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,64 (s, 6H), 3,58-3,48 (m, 1H), 2,14 (s, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxiphenyl)-8-propylchroman-7-ol (Hợp chất 16) (**1-4o**) (80%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,76 (m, 1H), 6,65 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,45-33 (m, 3H), 6,05 (s, 2H), 4,44 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,56 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,65 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 1,07 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxiphenyl)-6-etylchroman-7-ol (Hợp chất 18) (**1-4p**) (80%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,76 (m, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,56-38 (m, 3H), 6,05 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,12 (m, 1H), 3,55 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,51 (m, 2H), 1,05 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(3,4-metylendioxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxiphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 32) (**1-4q**) (80%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,08 (s, 1H), 7,01 (s, 1H), 6,71 (m, 2H), 6,55 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,23 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 6,06 (s, 2H), 4,47 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,65 (s, 6H), 3,46 (m, 1H), 2,05 (s, 3H).

4-(4-aminophenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-methylchroman-7-ol (Hợp chất 21) (**1-4r**) (70%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,67(m, 1H), 6,45-33 (m, 5H), 6,09 (s, 2H), 4,47 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 3,64 (s, 6H), 3,35 (m, 1H), 2,06 (s, 3H).

4-(4-ethylaminophenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-methylchroman-7-ol (Hợp chất 22) (**1-4s**) (78%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,65 (m, 1H), 6,51-39 (m, 5H), 6,01 (s, 2H), 4,65 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 3,65 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 3,11 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,32 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-6-ethyl-8-methylchroman-7-ol (Hợp chất 33) (**1-4t**) (80%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,75 (m, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,45 (m, 3H), 6,01 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 1,07 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-8-ethylchroman-7-ol (Hợp chất 34) (**1-4u**) (86%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,72 (m, 1H), 6,56 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,50-33 (m, 4H), 6,01 (s, 2H), 4,51 (m, 1H), 4,32 (m, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,65 (m, 2H), 1,06 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-6-methylchroman-7-ol (Hợp chất 35) (**1-4v**) (96%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,67 (m, 1H), 6,56 (s, 1H), 6,45-32 (m, 4H), 6,01 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,32 (m, 2H), 3,67 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,06 (s, 3H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-5-flochroman-7-ol (Hợp chất 19) (**1-4w**) (66%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,67 (m, 1H), 6,45 (m, 2H), 6,25 (m, 1H), 6,18 (m, 1H), 6,01 (s, 2H), 4,50 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,67 (s, 6H), 3,45 (m, 1H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-6-chlorochroman-7-ol (Hợp chất 20) (**1-4x**) (56%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,16 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,75 (m, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,45 (m, 1H), 6,01 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 3,67 (s, 6H), 3,45 (m, 1H).

4-(3-clo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 24) (**1-4y**) (66%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 8,1 (s, 1H), 7,6 (s, 1H), 7,0 (s, 1H), 6,65-50 (m, 4H), 6,42 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,01 (s, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,35 (m, 2H), 3,64 (s, 6H), 3,46 (m, 1H).

4-(3-flo-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-6-etyl-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 36) (**1-4z**) (80%). ^1H NMR (300 MHz, Axeton- d_6) δ 6,75 (m, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,45 (m, 3H), 6,01 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 1,07 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(3-metyl-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-6-etyl-8-metylchroman-7-ol (Hợp chất 37) (**1-4aa**) (88%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,22 (br, 2H), 7,66 (s, 1H), 6,62 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,55 (dd, $J = 7,1, 2,3$ Hz, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,38 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 5,95 (s, 2H), 4,48 (m, 1H), 4,21 (m, 2H), 3,61 (s, 6H), 3,45 (m, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,01 (s, 3H), 1,07 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(3-metyl-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-8-metyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetylphenyl)-2H-cromen-7-ol (hợp chất 38) (**1-4bb**) (80%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,65 (dd, $J = 7,1, 2,1$ Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,35 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 6,23 (s, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 3,45 (m, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,15 (s, 6H), 2,01 (s, 3H), 1,02 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(2-metyl-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-8-metyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetoxyphenyl)-2H-cromen-7-ol (hợp chất 39) (**1-4cc**) (76%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6,68 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,46 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 6,30 (dd, $J = 6,9, 2,1$ Hz, 1H), 5,92 (s, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,31 (m, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,41 (m, 1H), 2,51 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 1,01 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

4-(2-flo-4-hydroxyphenyl)-6-etyl-8-metyl-3-(4-hydroxy-3,5-dimetylphenyl)-2H-cromen-7-ol (hợp chất 40) (**1-4dd**) (70%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9,1 (br 1H), 8,75 (s, 1H), 7,22 (br 1H), 6,85 (dd $J = 6,6, 6,1$ Hz, 1H), 6,58 (brd, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,42 (s, 1H), 6,25 (brd, $J = 6,1$ Hz, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,35 (m, 1H), 2,45 (m, 2H), 2,18 (s, 6H), 2,11 (s, 3H), 1,05 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 2 được điều chế bằng cách phân giải không đối xứng trên Chiralcel OD-H pha tiêu chuẩn, 30 x 250 mm, cột 5 micron.

Phân tích hợp chất với thời gian lưu thấp nhất trên cột này chỉ rõ các đặc tính quay quang sau đây:

Quay quang đặc hiệu $[\alpha]^{25}_{589}$ Dung môi :METANOL Nồng độ:1,0%	+282,250°
--	-----------

Chất đồng phân đối ảnh với thời gian lưu dài nhất trên cột này có đặc tính quay quang sau đây.

Quay quang đặc hiệu $[\alpha]^{25}_{589}$ Dung môi :METANOL Nồng độ:1,0%	-277,00°
--	----------

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 6 được điều chế bằng cách phân giải không đối xứng trên Chiralcel OD-H pha tiêu chuẩn, 30 x 250 mm, cột 5 micron. Phân tích hợp chất với thời gian lưu thấp nhất (chất đồng phân đối ảnh 1) trên cột này chỉ rõ đặc tính quay quang sau đây:

Quay quang đặc hiệu $[\alpha]^{25}_{589}$ Dung môi :METANOL Nồng độ:0,1%	+238,835°
--	-----------

Chất đồng phân đối ảnh với thời gian lưu dài nhất (chất đồng phân đối ảnh 2) trên cột này có đặc tính quay quang sau đây:

Quay quang đặc hiệu $[\alpha]^{25}_{589}$ Dung môi :METANOL Nồng độ:0,1%	-259,410°
--	-----------

Chất đồng phân đối ảnh của hợp chất 9 được điều chế bằng cách phân giải không đối xứng trên Chiralcel OD-H pha tiêu chuẩn, 30 x 250 mm, cột 5 micron. Phân tích hợp chất với thời gian lưu thấp nhất (chất đồng phân đối ảnh 1) trên cột này chỉ rõ đặc tính quay quang sau đây:

Quay quang đặc hiệu $[\alpha]^{25}_{589}$ Dung môi :METANOL Nồng độ:0,1%	+252,727°
--	-----------

Chất đồng phân đối ảnh với thời gian lưu lâu nhất (chất đồng phân đối ảnh 2) trên cột này có đặc tính quay quang sau đây:

Quay quang đặc hiệu $[\alpha]^{25}_{589}$ Dung môi :METANOL Nồng độ:0,1%	-281,900°
--	-----------

Ví dụ 2 – Kiểm tra *in vitro*

Hoạt tính chống ung thư của hợp chất 2 (dạng raxemic và eutome và distome tinh khiết) được đánh giá bằng XenTech ở hai mô cấy thu được từ bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng được tạo ra từ sinh thiết khối u theo hệ phương pháp được nêu chi tiết. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp thu được từ mảnh ghép khác loài ODA14-RAV và GBM14-CHA được cấy mô và tách ra. Các tế bào được làm tan bằng nhanh trong bể nước 37°C. Một lọ tế bào (~10 triệu tế bào) được pha loãng trong 10mL môi trường phát triển hoàn thiện (F12/DMEM được cung cấp với 8% huyết thanh bào thai bò, 100 µg/ml penixilin G natri, 100 µg/ml streptomycin sulfat). Sau khi ly tâm ở 150xg trong 5 phút, viên kết tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường phát triển hoàn thiện và dần mỏng với mật độ ít nhất là 140.000 tế bào/cm² trong bình nuôi cấy tế bào 75cm². Các tế bào được giữ ở 37°C trong môi trường được làm ẩm với 5% CO₂ trong ít nhất một tuần. Sau đó, tế bào được thu gom và được gieo trong đĩa 96 lỗ với mật độ $2,5 \times 10^3$ tế bào/lỗ đối với thử nghiệm tính độc tế bào. Các tế bào được ủ trong 48 giờ ở 37°C trước khi bổ sung hợp chất thử nghiệm. Các hợp chất thử nghiệm được bổ sung với nồng độ cuối mong muốn và được ủ tiếp trong 72 giờ.

Khả năng sống được của tế bào được đánh giá trước khi bổ sung hợp chất thử nghiệm (T0) và 72 giờ sau khi xác định hàm lượng tế bào ATP trong tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm khả năng sống của tế bào nhờ sự phát sáng CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

ODA14 được chỉ định là mức III (được xác định bằng mô bệnh học) nhạy với TMZ khi được đánh giá trong thử nghiệm mảnh ghép khác loài, đột biến p53, kiểu đại pTEN và có biểu hiện EGFR đã khuếch đại. GBM14 được chỉ định là đề kháng với TMZ, kiểu đại p53, đột biến pTEN, kiểu đại EGFR. Mức GBM chưa

được biết. Sau 72 giờ tiếp xúc với hợp chất 2, quan sát thấy IC_{50} là $0,14\mu M$ chống lại GBM14 và $48\mu M$ chống lại ODA14. Kết quả này được thể hiện trên Fig.1. Sau 72 giờ tiếp xúc với eutome của hợp chất 2, quan sát thấy IC_{50} là $0,051\mu M$, trong khi trái lại distome của hợp chất 2 có IC_{50} là $3,43\mu M$ (xem Fig.2) chống lại dòng tế bào GBM14-CHA. Các số liệu này chứng minh rằng eutome của hợp chất 2 (+ chất đồng phân đối ảnh) có hoạt tính hơn gấp khoảng 2-3 lần chống lại GBM14-CHA so với raxemat của hợp chất 2 và hoạt tính lớn hơn >60 lần so với distome của hợp chất 2 (- chất đồng phân đối ảnh).

Các chất đồng phân đối ảnh của các hợp chất 6 và 9 cũng được đánh giá chống lại dòng tế bào u nguyên bào đệm GBM14-CHA bằng cách sử dụng hệ phương pháp nêu trên. Kết quả được thể hiện dưới đây ở bảng 1.

Bảng 1: Số liệu IC_{50} đối với raxemat và dạng đối xứng của các hợp chất 6 và 9 chống lại dòng tế bào u nguyên bào đệm GBM14-CHA

Hợp chất	Dạng đối xứng	IC_{50} (μM)
6	Raxemat	0,19
	Chất đồng phân đối ảnh 1	0,069
	Chất đồng phân đối ảnh 2	28,3
9	Raxemat	0,19
	Chất đồng phân đối ảnh 1	0,017
	Chất đồng phân đối ảnh 2	11,29

Như được quan sát đối với hợp chất 2, eutome của hợp chất 6 và 9 được bắt ngờ có hoạt tính hơn so với distome tương ứng.

Hoạt tính chống tăng sinh của hợp chất 2 cũng được đánh giá ở các dòng tế bào nhạy với TMZ (D54-S và U87-S) hoặc đề kháng với TMZ (D54-R và U87-R) tương ứng (Hong Kong University, Dr Gilberto Leung). Số liệu này chứng minh rằng TMZ đã giảm hiệu lực chống lại các dòng phụ của cả U87 và D54 đề kháng với TMZ so với các dòng phụ nhạy với TMZ tương ứng của chúng. Trái với TMZ, hợp chất 2 và eutome của nó chứng minh hoạt tính chống tăng sinh đẳng thể chống

lại cả hai dòng tế bào D54 và U87 GBM bất chấp trạng thái kháng TMZ của chúng. Hai hệ phương pháp (SRB và MTT) được sử dụng để đánh giá khả năng sống được và cả hai cho thấy rằng hợp chất 2 có hiệu lực bằng nhau trong việc ức chế khả năng sống được của tế bào GBM bất chấp trạng thái kháng TMZ. SRB hướng đến sự đánh giá quá cao tính độc tế bào so với MTT. Tuy nhiên, giá trị IC_{50} là dưới $0,36\mu M$ bất chấp hệ phương pháp, dòng tế bào, và trạng thái TMZ khi được điều trị bằng hợp chất 2. Do đó, giá trị IC_{50} của hợp chất 2 thấp hơn rõ rệt so với TMZ, ngay cả khi chống lại các dòng phụ nhạy với TMZ. Eutome của hợp chất 2 cũng là đẳng thể chống lại các dòng phụ nhạy với TMZ và kháng TMZ, nhưng hiệu quả chống lại bệnh ung thư là hữu hiệu hơn đối với chất đồng phân đối ảnh có hoạt tính so raxemat. Giá trị IC_{50} dưới $0,065\mu M$ bất chấp dòng tế bào và trạng thái TMZ (xem bảng 2).

Bảng 2: Khả năng sống của tế bào của dòng phụ nhạy và kháng với TMZ U87 và D54 sau khi điều trị bằng TMZ, hợp chất 2, hoặc eutome của hợp chất 2 *

Hợp chất	TMZ (SRB)	Hợp chất 2 (SRB)	Hợp chất 2 (MTT)	Hợp chất 2 (+ chất đồng phân đối ảnh) (MTT)
Nhạy với U87	609,12	0,106	0,329	0,037
Kháng U87	1828,51	0,128	0,358	0,041
Nhạy với D54	630,99	0,090	0,271	0,065
Kháng D54	2755,76	0,092	0,215	0,065

*Khả năng sống của tế bào (IC_{50}) ở 72 giờ sau khi điều trị được xác định bằng SRB hoặc MTT (như được chỉ rõ). IC_{50} tính theo μM .

Hoạt tính chống tăng sinh của eutome của hợp chất 9 (+ chất đồng phân đối ảnh) cũng được đánh giá và được phát hiện là đẳng thể chống lại các dòng phụ nhạy và kháng TMZ của cả U87 và D54 và giống với eutome của hợp chất 2, giá trị IC_{50} là dưới $0,065\mu M$ bất chấp dòng tế bào và trạng thái TMZ.

Hiệu lực của eutome của hợp chất 9 và 36 cũng được kiểm tra chống lại các dòng tế bào u nguyên bào thần kinh ở trẻ em. Giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ $0,020\mu M$ đến $0,088\mu M$ đối với eutome của hợp chất 9 và nằm trong khoảng từ $0,243\mu M$ đến $0,698\mu M$ đối với eutome của hợp chất 36. (xem bảng 3). Nhiều hơn

hai bệnh ung thư về thần kinh ở trẻ em được đánh giá về tính nhạy đối với eutome của hợp chất 9. Các thử nghiệm *in vitro* cũng chứng minh hiệu quả mức micromol thấp đến dưới micromol chống lại dòng tế bào DIPG, và hiệu quả mức nanomol chống lại dòng tế bào u nguyên bào tủy (D283L = 0,097 μ M; 547L = 0,063 μ M; và D425L = 0,101 μ M). Cùng với các thử nghiệm trước đó sử dụng các dòng tế bào GBM và môi trường nuôi cấy PDX, các kết quả này đề xuất rằng hợp chất 9 có hiệu quả đáng kể chống lại nhiều bệnh ung thư về thần kinh bao gồm bệnh ung thư ở trẻ em nghiêm trọng.

Bảng 3: Tính độc tế bào của eutome của hợp chất 9 và 36 chống lại u nguyên bào thần kinh*

Dòng tế bào	Tình trạng P53	Tình trạng nMYC	Cpd 9 (+ chất đồng phân đối ảnh) IC ₅₀ (μ m)	Cpd 36 (+ chất đồng phân đối ảnh) IC ₅₀ (μ m)
CHLA-20	kiểu đại	không được khuếch đại	0,061	0,243
CHP-134	kiểu đại	được khuếch đại	0,020	0,698
CHLA-90	đột biến	không được khuếch đại	0,088	0,336
SK-N-Be(2)	đột biến	được khuếch đại	0,064	0,308

* Khả năng sống của tế bào được đánh giá sau 72 giờ

Khả năng của các hợp chất từ 1 đến 14 để ức chế quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư buồng trứng được thực hiện từ việc mô cấy thu được từ bệnh nhân. Phòng thí nghiệm của Dr Gil Mor (Yale University) đã nhận dạng hai loại tế bào ung thư buồng trứng biểu mô: loại I là tế bào ung thư buồng trứng biểu mô CD44+ve (EOC), kháng hóa chất, và loại II là tế bào EOC CD44-ve nhạy hóa chất. Tế bào gốc ung thư buồng trứng được điều chế như được mô tả trước đó (Alvero *et al.*, 2009). Quá trình tăng sinh tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng hệ thống hình ảnh động học Incucyte. Tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất được đánh giá đồng thời bằng cách sử dụng thử nghiệm tính độc tế bào CellPlayer sử dụng CellToxTM (Promega, Cat#: G8731). Các tế bào đơn lớp được trypsin hóa và được dàn mỏng trong đĩa 96 lỗ. Sau 24 giờ, khi các tế bào đã gắn kết, dung dịch xử lý

được phân tán trong RPMI với 10% FBS. Nồng độ được chất được sử dụng là: 0,001, 0,01, 0,1, 1, và 10 μ g/ml. Sự pha loãng thích hợp chất phản ứng CellTox™ (tỷ lệ 1:1000) được bổ sung vào mỗi lỗ sau khi bổ sung hợp chất thử nghiệm. Các đĩa nuôi cấy được đặt ngay vào hệ thống Incucyte và được tạo hình ảnh mỗi 2 giờ bằng cách sử dụng sự lựa chọn “Phát huỳnh quang và tương phản pha” trên thiết bị Incucyte. Đường cong phát triển được tính toán dưới dạng xác định sự nhập dòng tế bào bằng cách sử dụng thuật toán nhập dòng tích hợp ở dạng vật thay thế cho số tế bào để xác định tỷ lệ tăng sinh. Sau đó, diện tích dưới đường cong được tính toán từ đồ thị CstTox số lần đếm/mm² theo thời gian được sử dụng để tính toán IC₅₀. Trong các thử nghiệm lặp lại, thấy rằng hợp chất 2 là hữu hiệu nhất trong việc làm chậm quá trình tăng sinh của tế bào gốc ung thư buồng trứng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,1 μ g/ml đối với OCSC-1 và OCSC-2. Các hợp chất 6, 9 và 13 cũng là hữu hiệu trong việc ức chế quá trình tăng sinh của các tế bào OCSC-2 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1 μ g/ml (bảng 4). Hợp chất 2 còn tạo ra hiệu quả tương tự chống lại các tế bào F2 ở nồng độ cao hơn gấp logarit (0,1-1 μ g/ml). Khi được đánh giá, tất cả các chất tương tự khác đều thể hiện hoạt tính chống tăng sinh nằm trong khoảng từ 1 đến 10 μ g/ml (xem bảng 4).

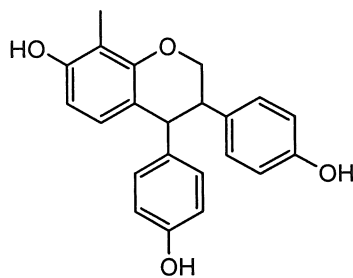
Bảng 4: Hiệu quả chống ung thư của một loạt các hợp chất chống lại tế bào gốc ung thư buồng trứng

Hợp chất	Khoảng IC ₅₀ (μ M)		
	OCSC1	OCSC2	F2
1	1 – 10	1 – 10	NT
2	0,1 – 0,01	0,1 – 0,01	0,1 - 1
3	>10	1 – 10	NT
4	1 – 10	1 – 10	NT
5	NT	1 – 10	NT
6	NT	0,1 – 1	NT
7	NT	>10	NT
8	NT	1 – 10	NT
9	NT	0,1 – 1	NT
10	NT	1 – 10	NT
11	NT	1 – 10	NT
12	NT	>10	NT
13	NT	0,1 – 1	NT
14	NT	>10	NT

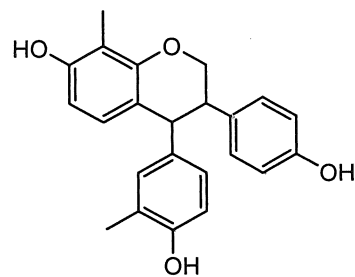
NT = không kiểm tra

Thử nghiệm xác nhận bằng cách sử dụng thử nghiệm hợp dòng Incucyte mà sử dụng số lượng lớn hơn các nồng độ chứng minh rằng hợp chất 2 có IC_{50} là $0,052\mu\text{g/ml}$ chống lại OCSC2. Quan sát này còn được xác nhận bằng cách sử dụng màu xanh lá cây Cytotox, chất phản ứng nhuộm mà khai thác tính nguyên vẹn màng bị suy giảm của tế bào bị chết, với chất phản ứng có thể đi qua màng và gắn kết với ADN nhờ đó giải phóng tín hiệu phát huỳnh quang mà có thể định lượng được. IC_{50} cho hợp chất 2 bằng cách sử dụng màu xanh lá cây CellTox là $0,051\mu\text{g/ml}$. Các số liệu này chứng minh rằng hợp chất 2 là hợp chất có hoạt tính chống ung thư cao như được đánh giá bởi hai hệ phương pháp khác nhau. Giá trị IC_{50} là $0,12\text{g/ml}$ cũng được tạo ra đối với các hợp chất 9 và 13 (xem Fig.3 và Fig.4).

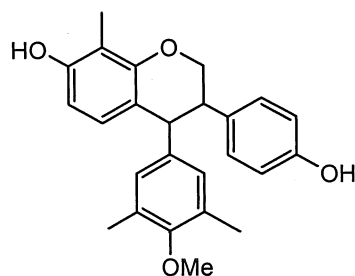
Khả năng các hợp chất được chọn ức chế quá trình tăng sinh của tế bào ung thư đại diện là u melanin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư vú (âm tính với thụ thể estrogen (ER-ve, TNBC-ER-ve, âm tính với thụ thể progesteron và âm tính với sự khuếch đại EGFR), bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy và bệnh ung thư não được thử nghiệm. Số lượng xác định trước của tế bào như được tính toán từ thử nghiệm phát triển tế bào cho mỗi dòng tế bào sử dụng được gieo cấy vào các môi trường nuôi cấy tương ứng của chúng (sử dụng các thông số môi trường nuôi cấy ATCC - <http://www.atcc.org>) và nuôi cấy trong 24 giờ ở 37°C và 5% CO_2 trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ. Khi được gắn, mỗi dòng tế bào được cho tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của mỗi chất tương tự tương ứng (30, 3, 0,3 và $0,03\mu\text{M}$), nuôi cấy trong 72 giờ nữa và cho tiếp xúc với chất phản ứng phát sáng chuẩn độ tế bào ($100\mu\text{l}$ /lỗ) trong 30 phút nữa). Sự phát sáng đạt được bằng cách sử dụng bộ đọc đa nhãn EnVision và số liệu cho mỗi nồng độ của chất tương tự so với mẫu đối chứng. Đồ thị bán-logarit của phần trăm mẫu đối chứng so với nồng độ được tạo ra và IC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích hồi quy tuyến tính. Số liệu này được trình bày trên bảng 5 và 6. Ở bảng 6, các hợp chất so sánh 1, hợp chất so sánh 2 và hợp chất so sánh 3 là các hợp chất so sánh có cấu trúc sau:



Hợp chất 1



Hợp chất 2



Hợp chất 3

Bảng 5: Đánh giá một loạt các hợp chất về khả năng của chúng làm chậm quá trình tăng sinh của các tế bào thân ung thư

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)							
	Ruột kết trực tràng	U melanin	Tuyến tiền liệt		Vú		Phổi (không tế bào nhỏ)	Gan
	HT-29	SK-Mel-28	PC3	DU1 45	MC F-7	MDA-MB-231	A549	Hep G2
1	11	>30	>30	>30	>30	13,7	>30	>30
2	8,2	1,4	1,49	0,08	13,6	0,8	0,04	1,9
3	7,5	>30	>30	15,1	26,7	7,5	11,8	>30
4	4,1	>30	>30	4,5	>30	9,9	6,9	>30
5	6,6	>30	>30	>30	>30	21,8	8,4	>30
6	8,4	>30	0,5	0,8	>30	1,7	0,7	2
7	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
8	4,3	>30	27	9,4	>30	>30	25,3	>30
9	6,5	2,7	0,12	0,13	>30	0,13	0,13	3,7
10	8,4	>30	6,2	25,2	>30	29,9	8,3	26,9
11	5	>30	1,4	3,1	>30	3,4	9,6	5,6
12	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
13	11,1	>30	0,8	1,5	>30	3	2,3	9,6

14	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
16	2,65	16,14	2,22	2,78	5,6	9,80	5,45	5,29
18	12,70	6,43	2,12	1,59	6,2	7,28	5,54	1,14
19	2,34	2,30	0,34	0,21	0,3	8,62	4,84	0,32
20	3,25	0,96	0,85	0,26	1,0	8,5	4,21	0,19
21	3,02	0,7	0,42	0,64	0,6	5,67	2,66	0,35
22	2,42	1,22	0,62	0,45	1,6	12,6	8,87	0,67
24	>30	>30	0,2	0,3	>30	4,4	2,06	>30
32	3,56	2,06	1,42	0,95	2,2	25,29	11,77	1,21
33	2,38	0,43	0,34	0,39	0,5	5,29	3,71	0,1
34	2,07	1,38	1,07	0,63	1,5	3,77	1,7	0,47
35	5,79	2,37	1,03	0,77	4,2	9,89	4,25	1,06
36	NT	0,16	0,18	NT	NT	0,2	0,24	NT
37	NT	0,21	0,53	0,44	NT	0,92	0,4	NT
38	NT	>30	1,40	5,51	NT	23,12	2,60	NT
39	NT	0,52	0,73	0,49	NT	1,43	0,8	NT
40	NT	>30	1,31	3,02	NT	14,11	1,91	NT

NT = không được kiểm tra

Bảng 6: Đánh giá dãy các hợp chất về khả năng của chúng để làm chậm quá trình tăng sinh của các tế bào thân ung thư

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)					
	Tuyến tụy	Não		Buồng trứng		
	MiaPaCa-2	U87-MG	A172	OVCAR-3	A2780	SK-OV-3
2	0,05	0,05	0,127	0,063	0,06	0,106
6	NT	0,478	0,193	0,063	NT	0,193
9	0,06	0,05	0,16	0,058	0,09	0,142
13	NT	0,513	0,388	0,171	NT	0,621
36	0,17	0,22	NT	NT	0,14	NT
37	0,52	0,38	NT	NT	0,32	NT
39	0,58	0,49	NT	NT	0,61	NT
So sánh 1	0,89	0,25	NT	NT	0,21	NT
So sánh 2	0,59	0,23	NT	NT	0,37	NT
So sánh 3	>3	>3	NT	NT	>3	NT

NT = không được kiểm tra

Số liệu này chứng minh rằng hợp chất 2 thể hiện hoạt tính chống tăng sinh hữu hiệu (IC₅₀ = <1μM) chống lại các dòng tế bào đại diện của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ NSCLC (A549), TNBC (MDA-MB-231) và bệnh ung thư tuyến tiền liệt (DU-145). Hợp chất 2 có hoạt tính vừa phải chống lại các tế bào ung thư gan (HepG2) (IC₅₀ = 1,9μM).

Các hợp chất 6 và 9 cũng biểu hiện hoạt tính hữu hiệu (IC₅₀ = <1μM) chống lại dòng tế bào NSCLC (A549) và cả dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt (PC3 và DU-145), không giống hợp chất 2 chỉ có hoạt tính chống lại DU-145. Hợp chất 6 và 9 cũng có hoạt tính vừa phải chống lại MDA-MB-231 (IC₅₀<2μM) và HepG2 (IC₅₀<4μM).

Bằng cách sử dụng cùng một hệ phương pháp, raxemat của hợp chất 2 và chất đồng phân đối ảnh của nó được đánh giá so với tế bào gốc u nguyên bào đệm A172 và tế bào gốc ung thư buồng trứng OVCAR-3. Như được quan sát trong thử nghiệm cấy mô GBM, eutome của hợp chất 2 có hoạt tính lớn hơn ít nhất 2 lần

chống lại cả hai dòng tế bào khi so với raxemat (xem Fig.5). Distome có hoạt tính ít hơn >5 lần so với raxemat (không được thể hiện).

Đưa ra khái niệm rằng các tế bào gốc ung thư còn lại trong khối u sau khi điều trị chịu trách nhiệm về việc tái phát khối u, chiến lược điều trị tới hạn để kéo dài sự sống là loại bỏ tận gốc các tế bào gốc u gây ra sự tái phát đó. Các thử nghiệm *in vitro* được thực hiện để xác định liệu hợp chất 2 có thể ức chế quá trình tăng sinh OCSC khi áp lực được chất đã được loại bỏ. Các tế bào OCSC-2 được điều trị bằng 0,1, 1 và 10 μ g/ml hợp chất 2 trong 24 giờ, rửa bằng môi trường nuôi cấy và cho phép thu hồi trong 50 giờ nữa trong các điều kiện ủ tiêu chuẩn. Đĩa nuôi cấy được đặt ngay vào hệ thống Incucyte và tạo ảnh mỗi 2 giờ. Đường cong phát triển được tính toán ở dạng xác định sự hợp dòng tế bào bằng cách sử dụng thuật toán hợp dòng tích hợp ở dạng thay thế cho số lượng tế bào để xác định tỷ lệ tăng sinh.

Trái với các tế bào OCSC-2 được điều trị bằng chất dẫn, các tế bào được điều trị sơ bộ bằng hợp chất 2 trong 24 giờ thất bại trong việc đi vào sự phát triển theo logarit sau 48 giờ nữa nuôi cấy trong môi trường không có được chất (xem Fig.6). Về mặt hình thái học, các tế bào xuất hiện thành hình tròn và có các thể chết theo chương trình đề xuất rằng các tế bào không sống được khỏi 24 giờ tiếp xúc (xem Fig.7).

Ví dụ 3 – Thử nghiệm tế bào

Các tế bào OCSC2 được đánh dấu bằng GFP và OCC2 được đánh dấu bằng mCherry được tạo ra bằng cách gây nhiễm tế bào bằng virus lenti biểu hiện các protein huỳnh quang (Craveiro *et al.* 2013). Đồng môi trường nuôi cấy của GFP+ OCSC2 và mCherry+ OCC2 được xử lý bằng 1 μ g/ml hợp chất 2 trong 48 giờ và cho phép thu hồi trong 72 giờ nữa. Sự phát huỳnh quang được xác định bằng phép soi kính hiển vi huỳnh quang. Hợp chất 2 làm giảm rõ rệt số lượng tế bào gốc markedly OCSC2 được đánh dấu bằng GFP và làm cho các tế bào OCC2 được đánh dấu bằng mCherry tạo thành hình tròn và nâng lên bề mặt môi trường nuôi cấy (xem Fig.8). Các số liệu này chỉ ra rằng hợp chất 2 phá vỡ quá trình tăng sinh của cả tế bào gốc ung thư buồng trứng và tế bào thân ung thư buồng trứng.

Dạng hình cầu của tế bào gốc ung thư buồng trứng thu được từ môi trường nuôi cấy phát triển trong các điều kiện đặc biệt được chọn cho tế bào với tiềm năng tự làm mới lại (Alvero *et al.*, 2009). Tóm lại, các tế bào CD44+ được ủ trong hệ huyền phù gồm ống thủy tinh theo cách quay liên tục để ngăn sự bám dính. Các tế bào này tạo ra các cụm trong 48 giờ và dạng hình cầu đặc trong 4 ngày. Sau đó, dạng hình cầu này được cho tiếp xúc với 0,1 và 1µg/ml hợp chất 2 và được kiểm tra bằng kính hiển vi sau 24 giờ. Sau 24 giờ tiếp xúc với hợp chất 2 ở 0,1µg/ml, cấu trúc nền của dạng hình cầu ung thư buồng trứng đã bắt đầu tan rã. Với 1µg/ml hợp chất 2, cấu trúc hình cầu gần như bị phá hủy hoàn toàn. Các số liệu này chứng minh rằng hợp chất 2 có thể thấm vào hình cầu và phá hủy cấu trúc nền của nó (xem Fig.9) và đề xuất rằng hợp chất này có thể đi vào môi trường vi mô của khối u .

Các tài liệu viện dẫn

Craveiro, V., Yang-Hartwich, Y., Holmberg, J. C., Sumi, N. J., Pizzonia, J., Griffin, B., Gill, S. K., Sliasi, D-A., Azodi, M., Rutherford, T., Alvero, A. B., Mor, G. (2013). "Phenotypic modifications in ovarian cancer stem cells following Paclitaxel treatment" *Cancer Medicine*, 2(6), 751-762.

Alvero A. B., Chen R, Fu H. H, Montagna M., Schwartz P. E., Rutherford T., Silasi D. A., Steffensen K. D., Waldstrom M., Visintin I., Mor G. (2009) "Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance" *Cell Cycle*. 2009 Jan 1;8(1):158-66.

Ví dụ 4 – Thử nghiệm được động học

Thử nghiệm tập tính được động học của các hợp chất 2, 6, 9, 13 được thực hiện. Kết quả chứng minh rằng các hợp chất có thể được phân phối và đạt được nồng độ huyết tương với cửa sổ hiệu lực được đề xuất.

Thử nghiệm này gồm giai đoạn 1, thử nghiệm chế phẩm sơ bộ đảm bảo tất cả các hợp chất đều hòa tan trong dung dịch 30% Captisol® và tạo thành hỗn hợp đồng nhất tích hợp để phân phối trong tĩnh mạch. Nhiều phương pháp LC-MS đã được phát triển và phê chuẩn một phần để đảm bảo mỗi chất phân tích có thể được định lượng từ nền huyết tương và không có sự nhiễu giữa bất kỳ chất phân tích nào. Giai đoạn 2 gồm thử nghiệm trong đời sống nhờ đó chuột Sprague-Dawley được

làm cho thích nghi với môi trường trong ba ngày trước khi được tiêm vào tĩnh mạch đuôi với liều catxet của bốn hợp chất, mỗi hợp chất với nồng độ cuối là 1mg/kg. Tổng ba con chuột được sử dụng trong thử nghiệm với việc lấy mẫu máu bằng ống chống đông tụ vào 5 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 8 giờ. Giai đoạn thứ ba của thử nghiệm là phân tích sinh học các chất phân tích. Các mẫu máu được ly tâm ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau khi RBC và huyết tương được tách, huyết tương được bảo quản ở -80°C cho đến khi được xử lý và tiêm vào LC-MS. Các mẫu từ các cá thể chuột được xử lý ở dạng các mẫu riêng lẻ với profin được động học PK được tạo ra từ giá trị trung bình của số liệu từ ba con chuột. Kết quả được thể hiện trên Fig.10.

Ví dụ 5 – Hiệu quả *in vivo*

Bằng cách sử dụng mô hình bên hông U87 nêu trên, sự phân phối thuốc đạn của eutome của hợp chất 9 với lượng 100mg/kg hằng ngày tạo ra hiệu quả trị khối u mạnh. Kết quả được thể hiện trên Fig.11. ANOVA hai chiều với hiệu chỉnh Sidak cho nhiều lần so sánh chỉ ra rằng kích thước khối u nhỏ hơn đáng kể chỉ 7 ngày sau khi bắt đầu điều trị và việc này tiếp tục qua đến ngày 12 (điểm thời gian cuối cùng được đánh giá). Tốc độ phát triển khối u cũng giảm đáng kể bởi eutome của hợp chất 9. Trọng lượng khối u tại điểm cuối cùng giảm đáng kể bởi eutome của hợp chất 9 so với mẫu đối chứng Captisol® (không cặp đôi t test, $P = 0,0036$). Trọng lượng cuối của chuột trong nhóm điều trị và nhóm đối chứng không khác nhau nhiều, tuy nhiên 3 con chuột trong nhóm điều trị gồm 7 con chết ban đầu (tất cả các con vật chết đều nằm trong điểm tứ phân vị thấp của khoảng trọng lượng con vật). Các con chuột này cũng thể hiện sự giảm đáng kể trong quá trình phát triển khối u, mặc dù, đối với độ đặc, số liệu từ các con vật đã được loại bỏ tạo ra tất cả số liệu được trình bày và từ phân tích thống kê. Như với phác đồ liều trước đó, không có dấu hiệu lâm sàng công khai về độ độc (tức là, rụng lông, trạng thái bệnh, tiêu chảy) được ghi nhận. Phân tích mô bệnh học đang xảy ra để nhận dạng nguyên nhân cái chết. Số lượng máu là bình thường.

Ví dụ 6 – Hiệu quả *in vivo*

Mô hình con vật bị bệnh ung thư buồng trứng được sử dụng để đánh giá hiệu *in vivo* của hợp chất 2 gồm việc tiêm trong màng bụng 7×10^6 tế bào gốc ung thư buồng trứng Cherry-CD44+ vào chuột thiếu tuyến ức. Trong mô hình này, sự tạo khối u lặp lại hình thái học của bệnh ung thư buồng trứng người, làm tăng các khối u lan tỏa chứa cả CD44+ và CD44- OCC, xác nhận rằng tế bào gốc ung thư được tiêm có thể tạo ra khối u không đồng nhất. Trong mô hình loài gặm nhấm này, sự phát triển khối u được đặc trưng bởi tình trạng ung thư biểu mô lan tỏa trong đó khối u được thấy ở buồng trứng, mạc treo ruột, phúc mạc, cơ hoành, gan, tụy, và lá lách. Mô hình này cũng bắt chước profin lâm sàng đối với bệnh ung thư buồng trứng và được đặc trưng bởi sự đáp ứng một phần ban đầu đối với paclitaxel hoặc cisplatin, sau đó là sự tái phát và kháng với liệu pháp ban đầu. Sự phát triển khối u được kiểm tra bằng ảnh sự sống bằng cách sử dụng hệ tạo ảnh Bruker huỳnh quang/tia X Vivo FX System (Bruker Corp., Billerica, MA) (Craveiro *et al.* 2013).

So với con vật đối chứng được điều trị bằng 20% Captisol®, eutome của hợp chất 2 được dùng liều theo phác đồ trong màng bụng hằng ngày được bào chế trong xyclodextrin làm giảm sự phụ thuộc liều đáng kể về tốc độ tăng sinh khối u (Fig.12A) và trọng lượng khối u giai đoạn cuối (Fig.12B). Chúng tôi quan sát sự đáp ứng phụ thuộc nồng độ trong đó các con vật được dùng liều hợp chất 2 với lượng 50mg/kg và 100mg/kg có sự giảm lần lượt 65% và >80% về trọng lượng khối u so với mẫu đối chứng.

Tài liệu viện dẫn

Craveiro, V., Yang-Hartwich, Y., Holmberg, J. C., Sumi, N. J., Pizzonia, J., Grffin, B., Gill, S. K., Sliasi, D-A., Azodi, M., Rutherford, T., Alvero, A. B., Mor, G. (2013). "Phenotypic modifications in ovarian cancer stem cells following Paclitaxel treatment" *Cancer Medicine*, 2(6), 751-762.

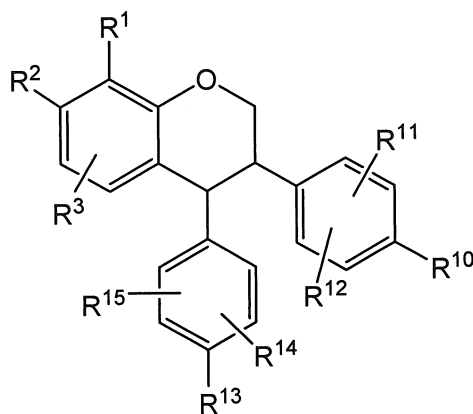
Tài liệu viện dẫn bất kỳ ở đây sẽ không được hiểu là chấp nhận rằng tài liệu viện dẫn này là có sẵn ở dạng giải pháp kỹ thuật đã biết đối với đơn này. Ngoài ra, tài liệu viện dẫn trong phần mô tả này đối với công bố ưu tiên bất kỳ (hoặc thông tin thu được từ đó), hoặc với vấn đề bất kỳ mà là đã biết, là không phải, và không được cho là sự thừa nhận hoặc chấp nhận hoặc dạng đề xuất bất kỳ rằng công bố ưu tiên

(hoặc thông tin thu được từ đó) hoặc vấn đề đã biết tạo ra một phần của kiến thức chung thông thường trong lĩnh vực này mà phần mô tả này đề cập đến.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thấy rằng sáng chế được mô tả ở đây dễ bị ảnh hưởng với các thay đổi và cải biến không giống với những điều được mô tả cụ thể. Cần phải hiểu rằng sáng chế bao gồm tất cả các thay đổi và cải biến như vậy. Sáng chế còn bao gồm tất cả các bước, dấu hiệu, được phẩm và các hợp chất được đề cập đến hoặc được chỉ rõ trong phần mô tả này, một cách riêng lẻ hoặc chung, và sự kết hợp bất kỳ và tất cả kết hợp của hai hoặc nhiều bước, dấu hiệu, được phẩm và hợp chất bất kỳ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức chung (I):



(I)

hoặc muối, hydrat, dẫn xuất, hoặc solvat được dụng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_6 alkyl;

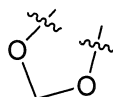
R^2 được chọn từ nhóm bao gồm: OH và C_1 - C_6 alkoxy;

R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_6 alkyl và halo;

R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OH, C_1 - C_6 alkoxy, NH_2 , $NHMe$, $NHEt$, $N(Me)_2$ và $N(Et)_2$;

R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, OH, C_1 - C_6 alkyl và halo, hoặc

R^{13} và một trong số R^{14} và R^{15} tạo thành cấu trúc sau:

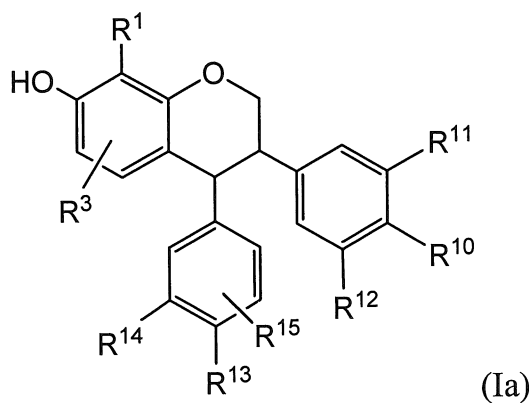


R^{10} là OH, và

R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, C_1 - C_4 alkyl và F.

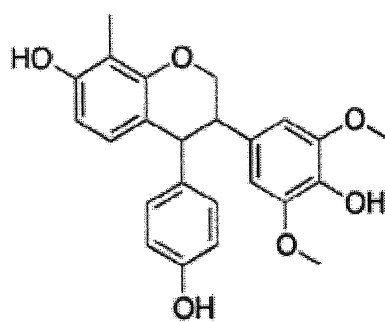
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R^1 được chọn từ nhóm bao gồm: H và C_1 - C_3 alkyl.
3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó R^2 là OH.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó R^3 được chọn từ nhóm bao gồm: H, C_1 - C_3 alkyl và halo.
5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, *tert*-butyl, methyl và F.
6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó R^{11} và R^{12} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: OMe, *tert*-butyl, và F.
7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó R^{13} được chọn từ nhóm bao gồm: OH, OMe, NH_2 , $NHEt$ và $N(Et)_2$.
8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó R^{14} và R^{15} độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: H, F, Cl và methyl.
9. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là có công thức (Ia) có cấu trúc sau:

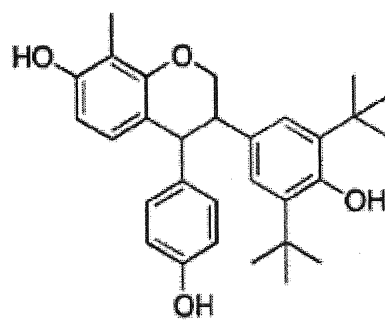


trong đó R^1 , R^3 và R^{10} đến R^{15} là như được xác định trong điểm 1.

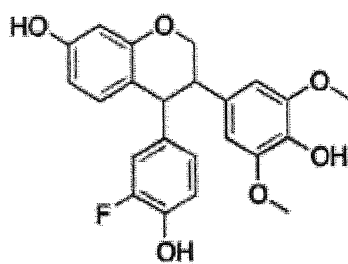
10. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:



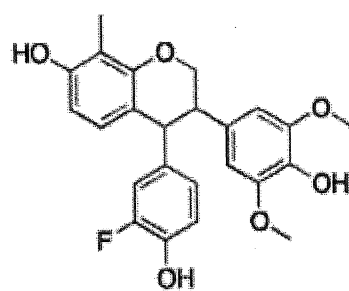
2



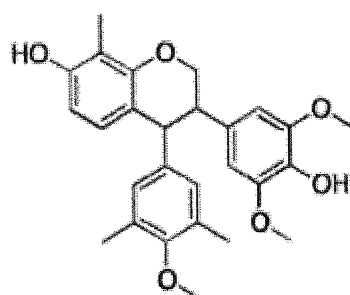
3



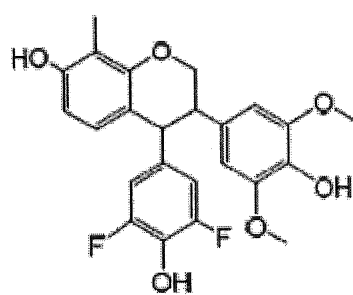
6



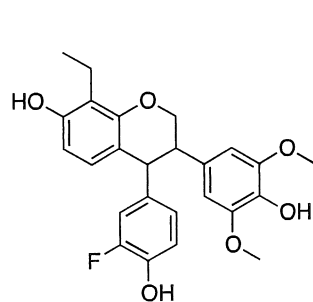
9



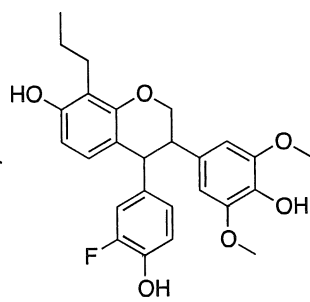
11



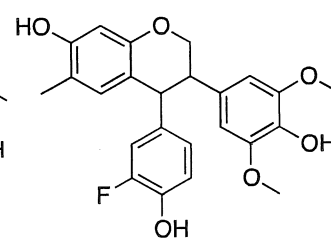
13



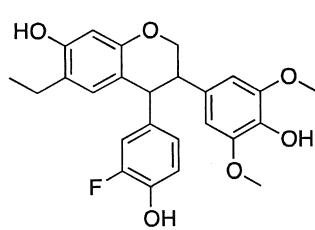
15



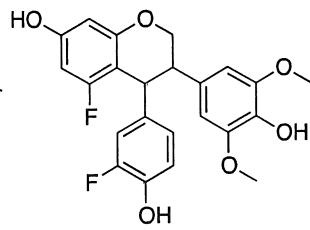
16



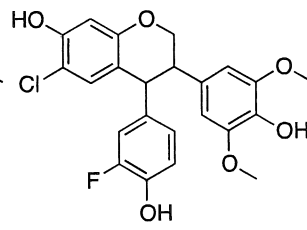
17



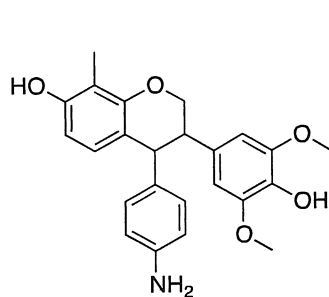
18



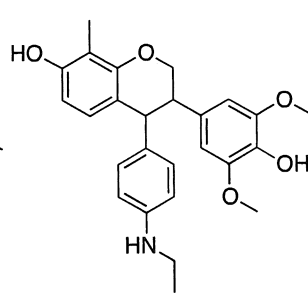
19



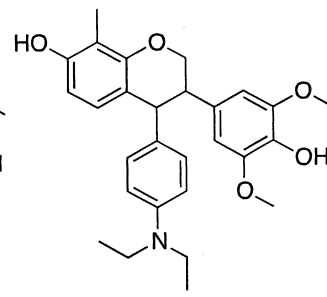
20



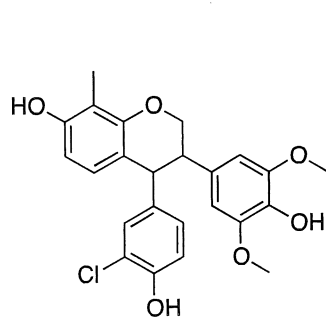
21



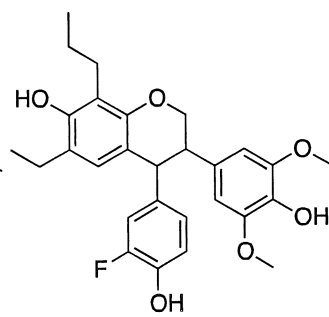
22



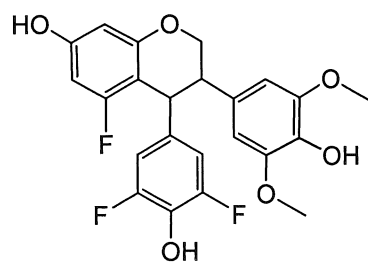
23



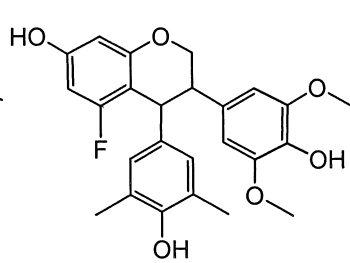
24



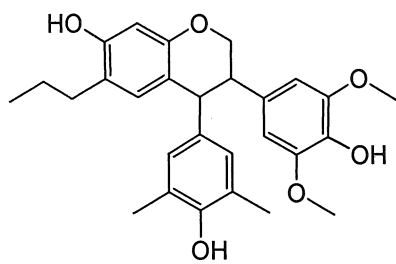
25



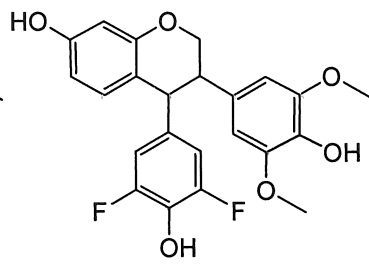
26



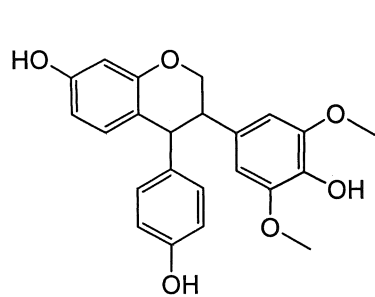
27



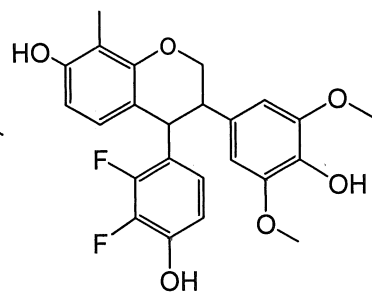
28



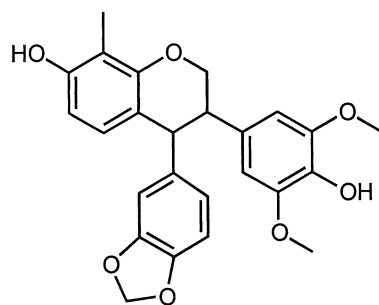
29



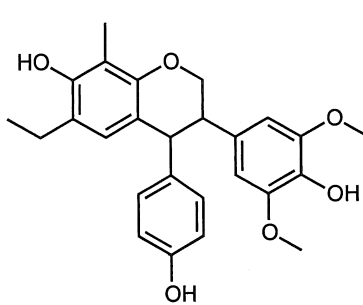
30



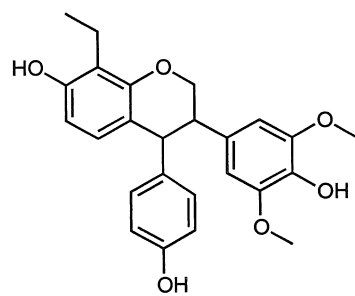
31



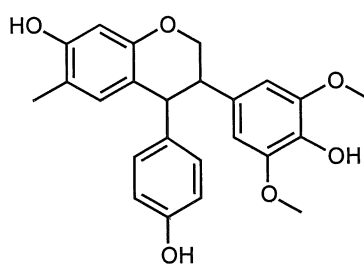
32



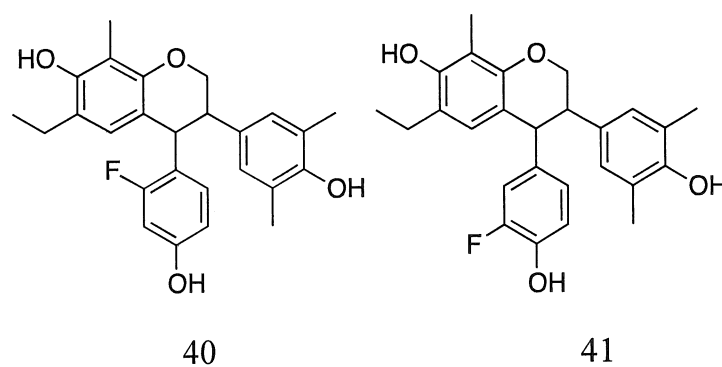
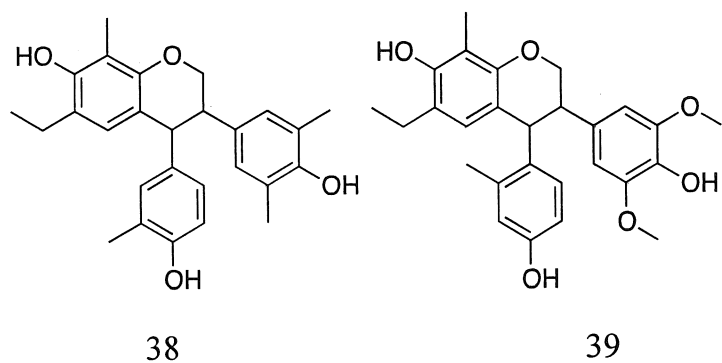
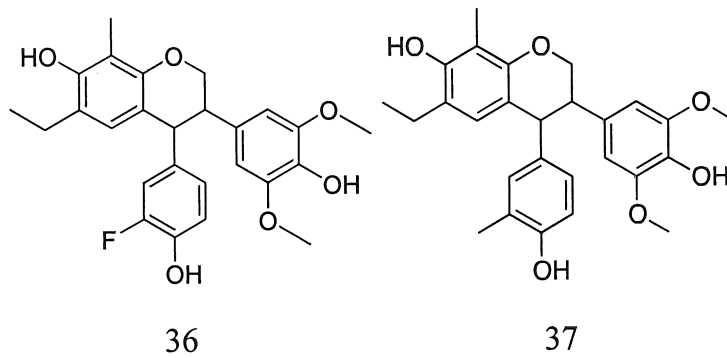
33



34



35



11. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 cùng với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

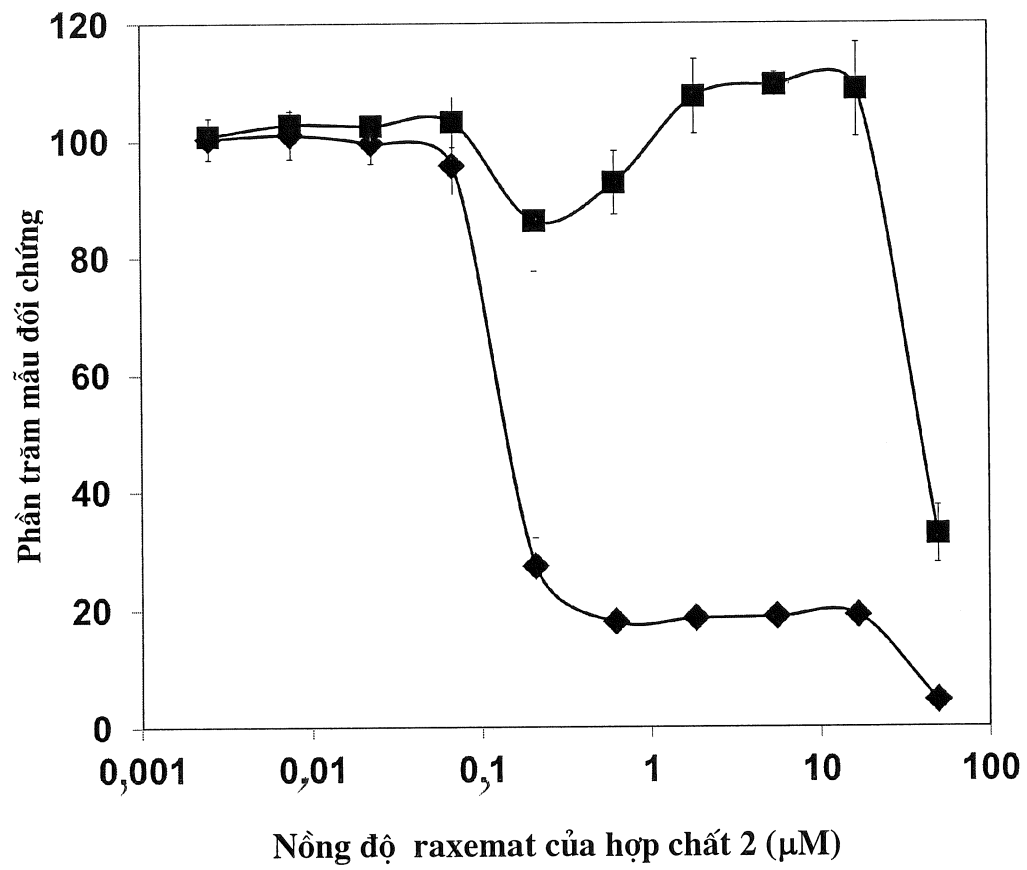


Fig.1

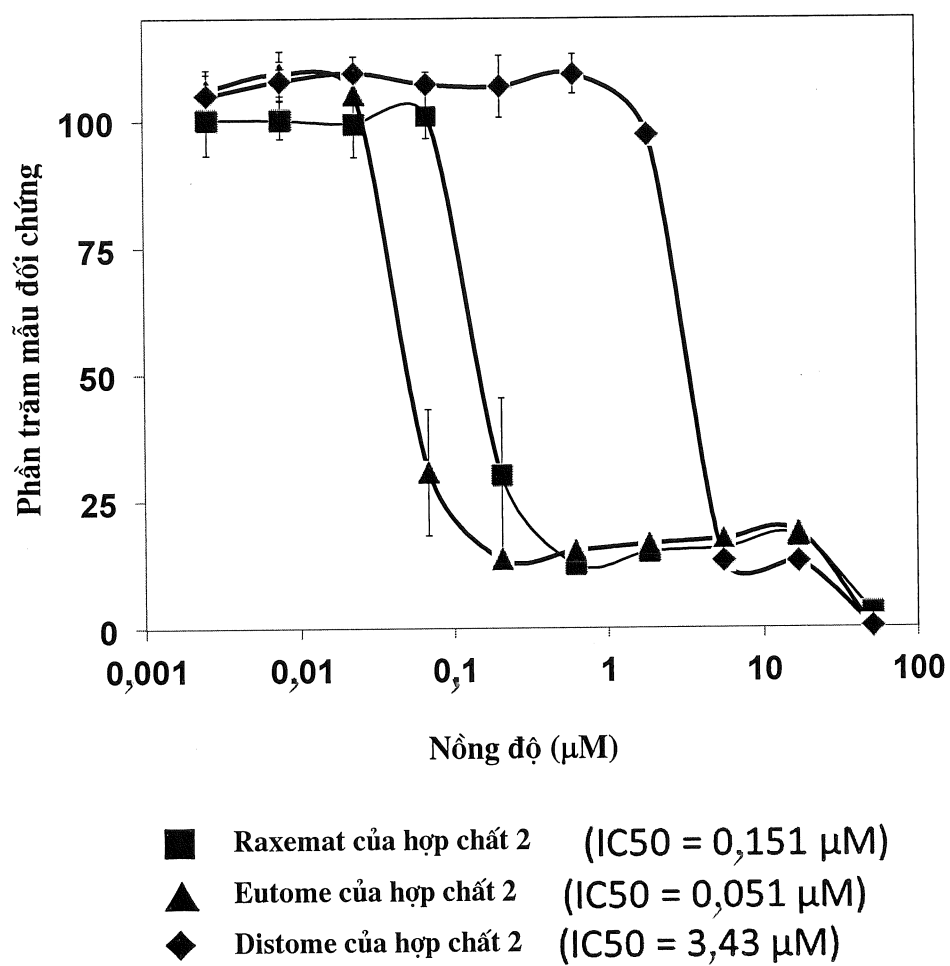


Fig.2



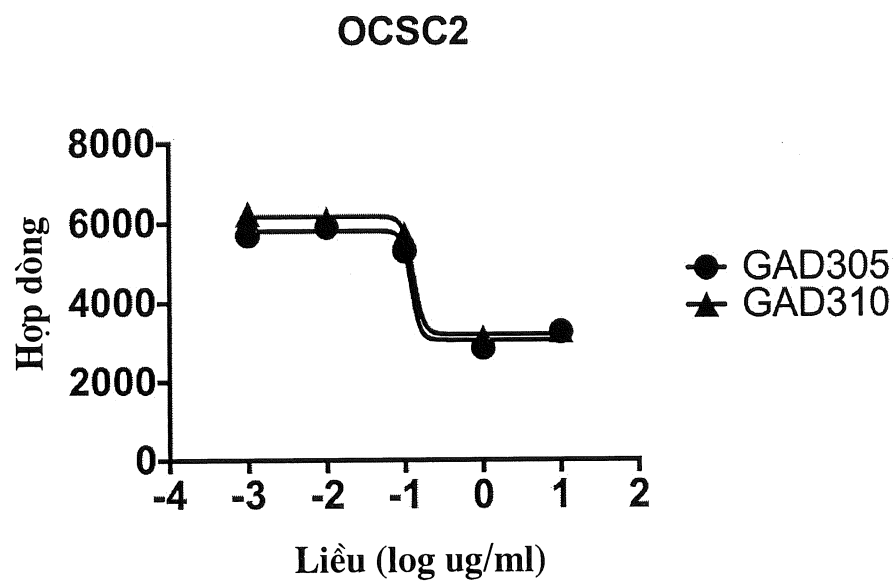


Fig.4

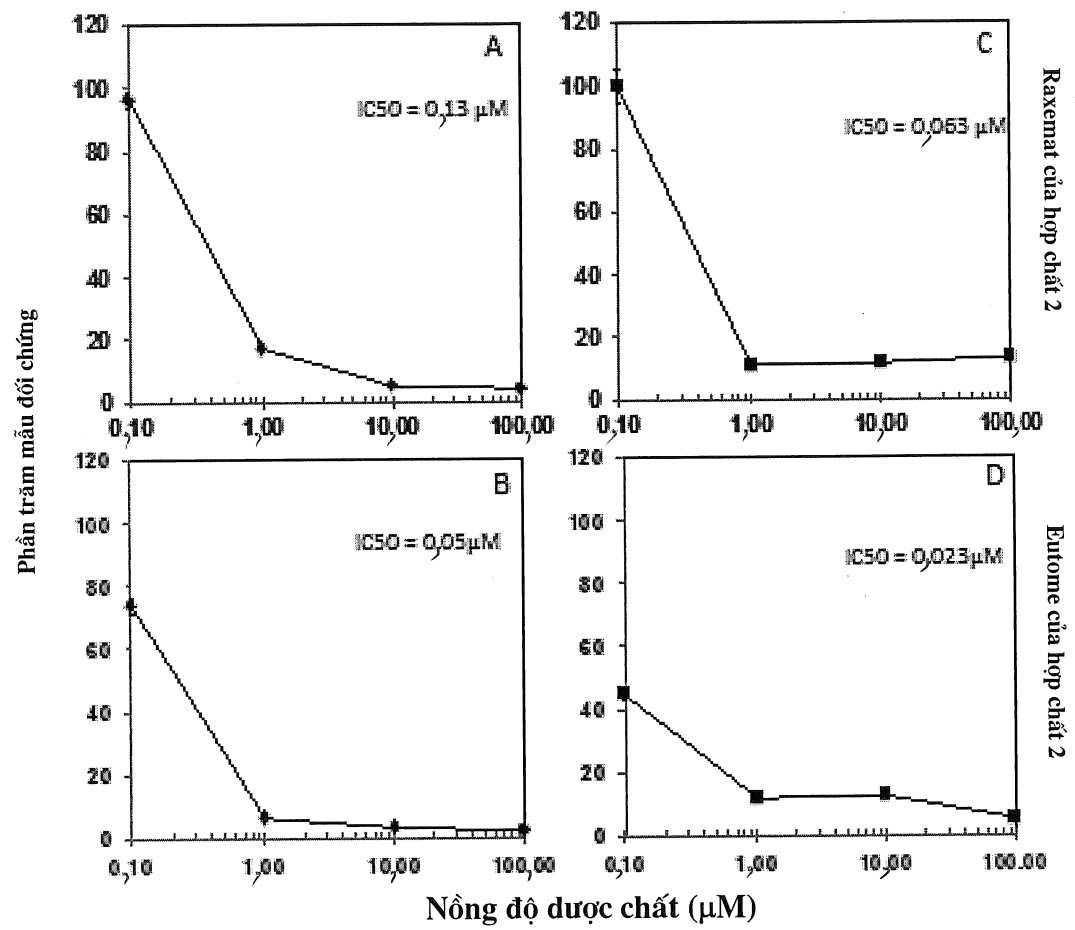


Fig.5

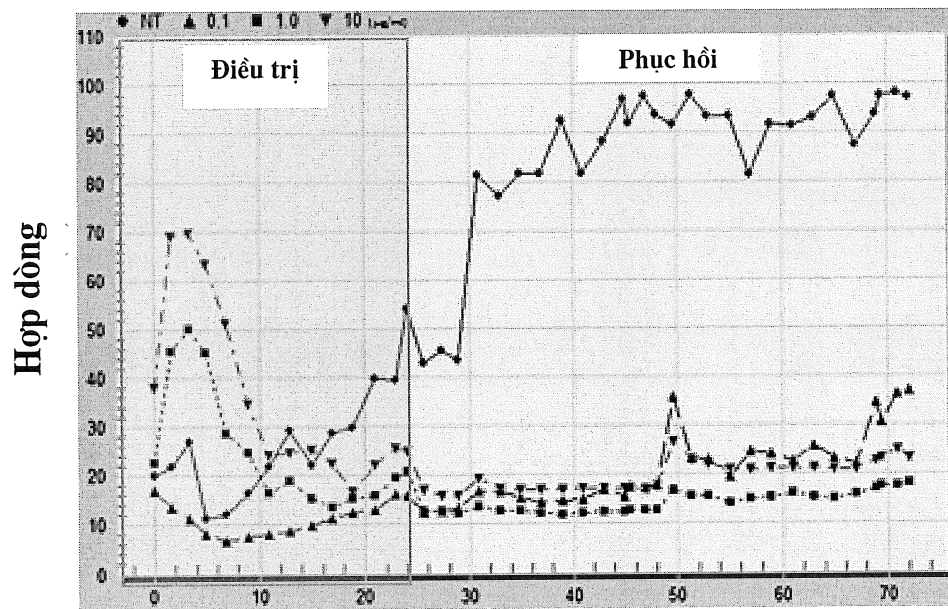


Fig.6

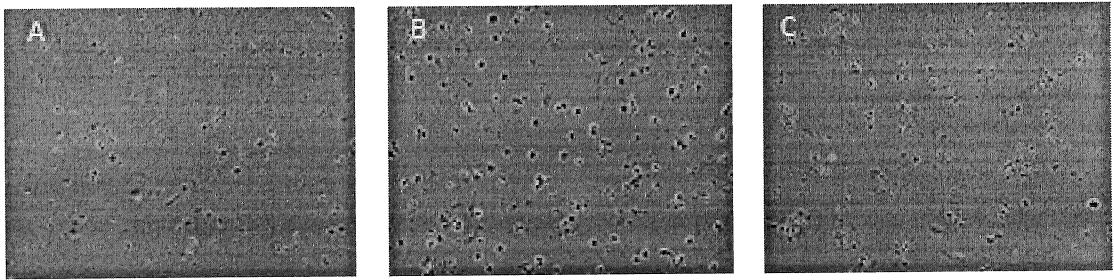


Fig.7

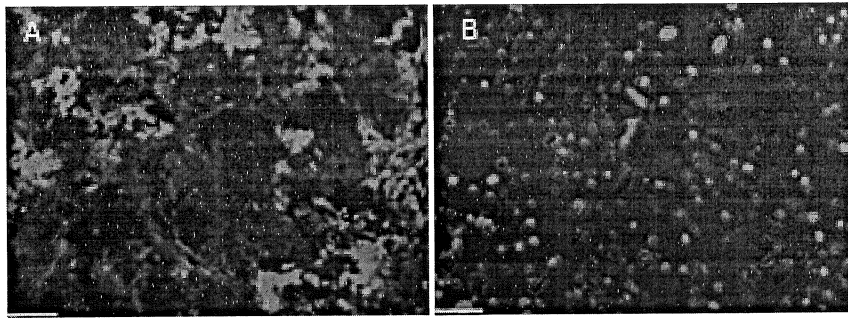


Fig.8

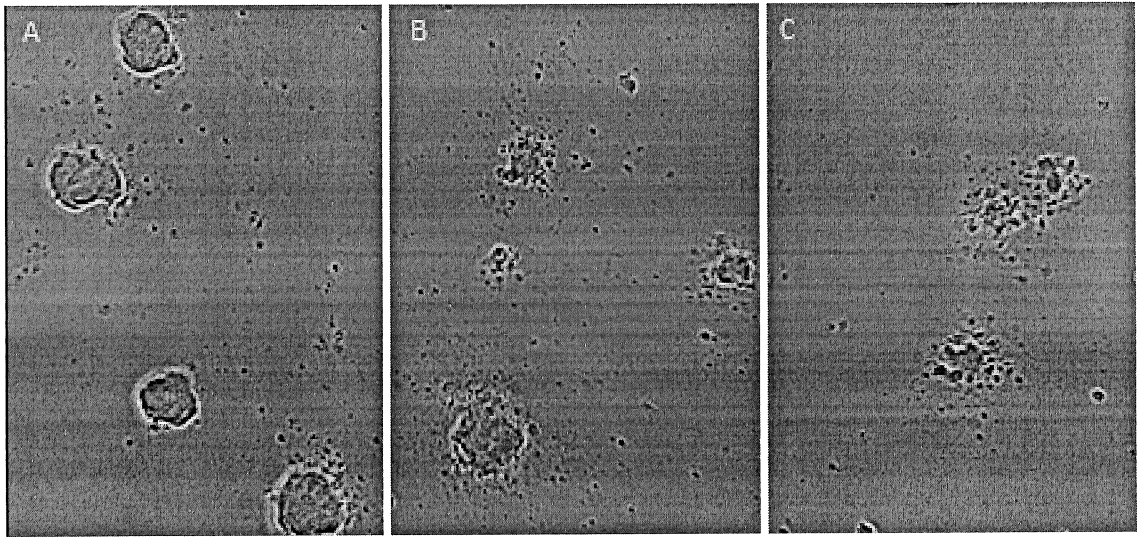


Fig.9

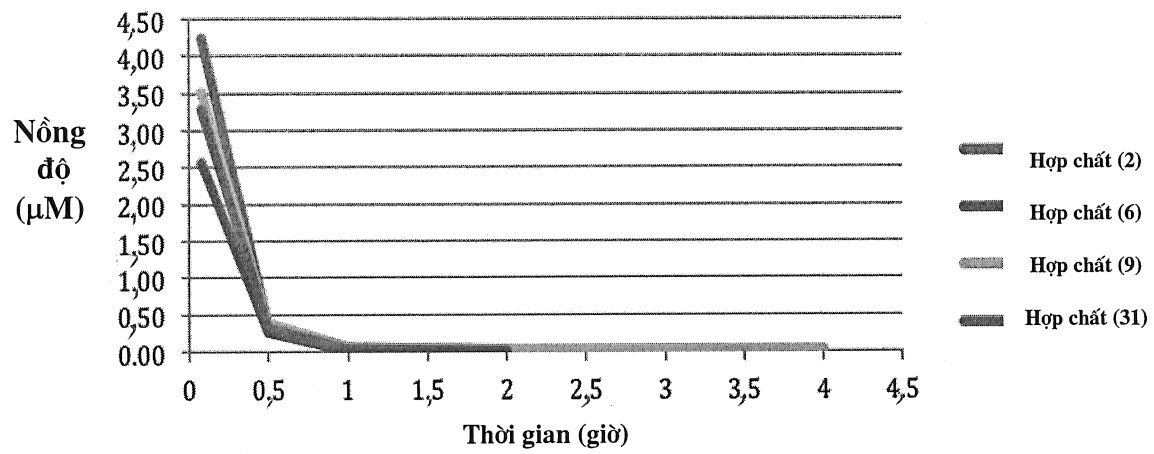


Fig.10

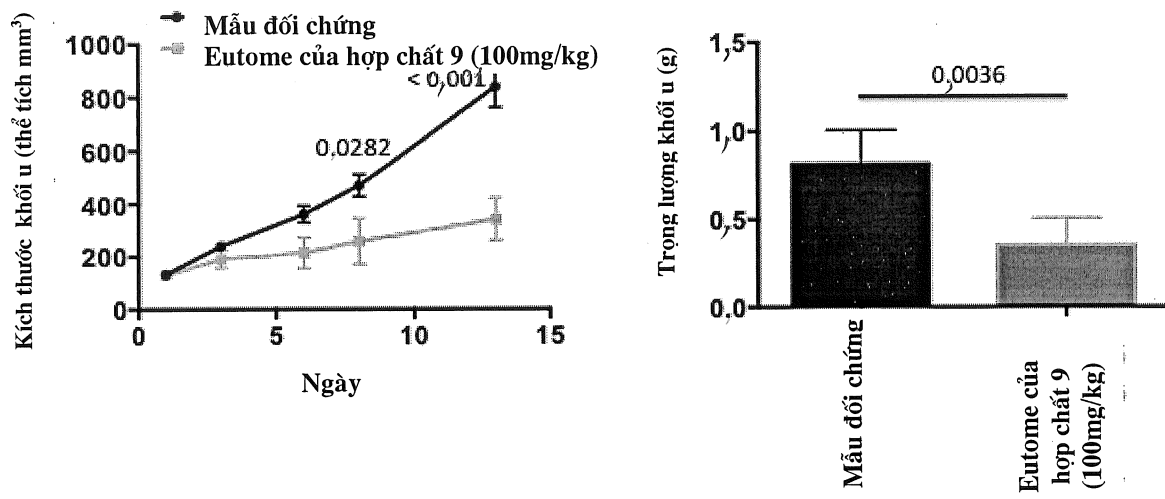


Fig.11

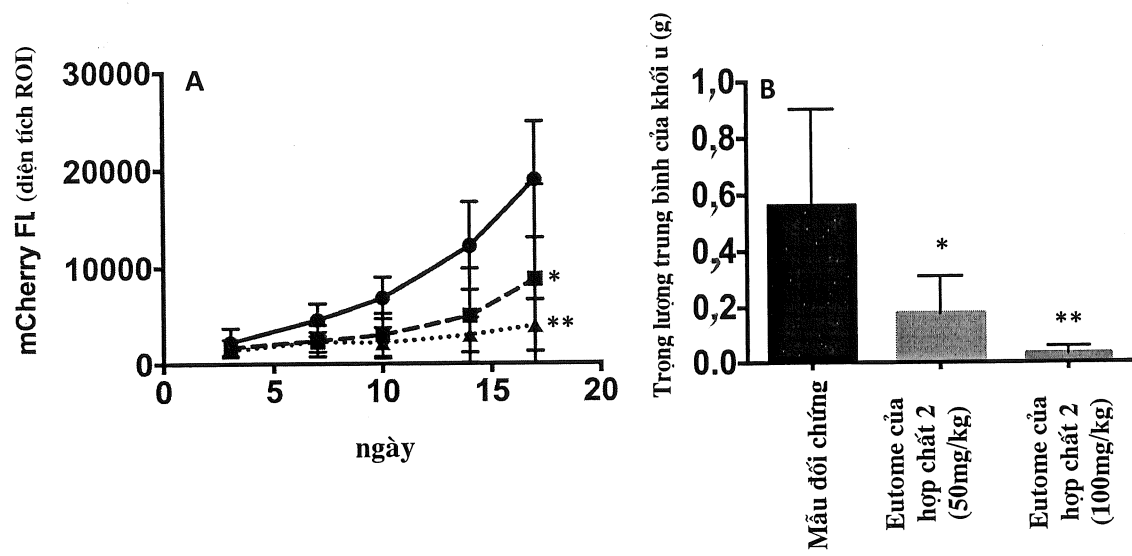


Fig.12