(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) **1-0035922**

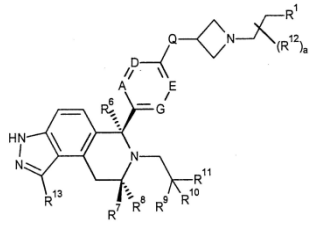
(51)[7] **C07D 471/04**; A61P 35/00; A61K 31/4738; A61K 31/497

(13) **B**

(21) 1-2019-02559 (22) 13/10/2017
(86) PCT/EP2017/076191 13/10/2017 (87) WO 2018/077630 03/05/2018
(30) 62/411,799 24/10/2016 US; 62/435,159 16/12/2016 US
(45) 26/06/2023 423 (43) 25/09/2019 378A
(73) ASTRAZENECA AB (SE)
SE-151 85 Södertälje, Sweden
(72) SCOTT, James, Stewart (GB); BARLAAM, Bernard, Christophe (FR); YANG, Bin (US); MOSS, Thomas, Andrew (GB); HUGHES, Samantha, Jayne (GB); NISSINK, Johannes, Wilhelmus, Maria (NL); O'DONOVAN, Daniel, Hillebrand (IE).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) DẪN XUẤT 6,7,8,9-TETRAHYĐRO-3H-PYRAZOLO[4,3-F]ISOQUINOLIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(57)



(I)

Sáng chế đề cập đến các hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của nó, quy trình và hợp chất trung gian được sử dụng để điều chế chúng, dược phẩm chứa chúng và sử dụng chúng trong việc điều trị rối loạn tăng sinh tế bào.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất inđazol nhất định và muối dược dụng của chúng mà điều hòa giảm một cách chọn lọc thụ thể estrogen và mang hoạt tính chống ung thư. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các hợp chất inđazol này và muối dược dụng của chúng trong phương pháp điều trị cho cơ thể người hoặc động vật, ví dụ như để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến quy trình và các hợp chất trung gian tham gia vào việc điều chế các hợp chất inđazol này và đề cập đến dược phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể estrogen alpha (ERα, ESR1, NR3A) và thụ thể estrogen beta (ERβ, ESR2, NR3b) là các thụ thể hormon steroit mà là thành viên của họ thụ thể nhân lớn. Có cấu trúc tương tự với tất cả các thụ thể nhân, ERα được tạo thành từ sáu miền chức năng (đặt tên là A-F) (Dahlman-Wright, et al., Pharmacol. Rev., 2006, 58:773-781) và được phân loại dưới dạng yếu tố phiên mã phụ thuộc phối tử bởi vì sau khi nó kết hợp với phối tử đặc hiệu, (hormon steroit giới tính nữ 17b estrađiol (E2)), phức hợp liên kết với trình tự hệ gen, được đặt tên là thành phần thụ thể estrogen (ERE) và tương tác với chất đồng điều hòa để điều biến sự phiên mã của gen đích. Gen ERα nằm trên 6q25.1 và mã hóa cho protein 595AA và nhiều chất đồng phân có thể được sản xuất do sự ghép nối khác nhau và vị trí bắt đầu dịch mã. Ngoài miền liên kết ADN (Miền C) và miền liên kết phối tử (Miền E) thụ thể này chứa miền (A/B) ở đầu tận cùng N, miền bản lề (D) mà nối các miền C và E và vùng kéo dài ở đầu tận cùng C (Miền F). Mặc dù các miền C và E của ERα và ERβ khá bảo toàn (lần lượt có độ tương đồng axit amin 96% và 55%) mức độ bảo toàn của các miền A/B, D và F kém (độ tương đồng axit amin dưới 30%). Cả hai thụ thể đều tham gia vào sự điều hòa và phát triển của đường sinh dục cái và ngoài ra đóng vai trò trong hệ thần kinh trung ương, hệ tim mạch và

trong sự chuyển hóa xương. Sự tác động hệ gen của ER xảy ra trong nhân của tế bào khi thụ thể liên kết ERE một cách trực tiếp (hoạt hóa trực tiếp hoặc con đường cổ điển) hoặc gián tiếp (hoạt hóa gián tiếp hoặc con đường không cổ điển). Khi không có mặt phối tử, ER được kết hợp với protein sốc nhiệt, Hsp90 và Hsp70, và bộ máy chaperone được kết hợp làm ổn định miền liên kết phối tử (LBD) làm cho nó có thể tiếp cận được đến phối tử. ER kết hợp phối tử phân ly từ protein sốc nhiệt dẫn đến sự thay đổi hình dạng của thụ thể mà cho phép sự đime hóa, sự liên kết ADN, sự tương tác với chất đồng hoạt hóa hoặc chất đồng kìm hãm và sự điều biến của sự biểu hiện gen đích. Trong con đường không cổ điển, AP-1 và Sp-1 là các trình tự ADN điều hòa thay thế lẫn nhau được sử dụng bởi cả hai đồng phân của thụ thể để điều biến sự biểu hiện gen. Trong ví dụ này, ER không tương tác một cách trực tiếp với ADN mà thông qua sự kết hợp với yếu tố phiên mã liên kết ADN khác ví dụ như c-Jun hoặc c-Fos (Kushner et al., Pure Applied Chemistry 2003, 75:1757-1769). Cơ chế chính xác mà ER ảnh hưởng đến sự phiên mã gen chưa được hiểu kỹ nhưng dường như được điều tiết bởi nhiều yếu tố nhân mà được tuyển mộ bởi thụ thể liên kết ADN. Việc tuyển mộ chất đồng điều hòa chủ yếu được điều tiết bởi hai bề mặt protein, AF2 và AF1 mà lần lượt nằm trong miền E và miền A/B. AF1 được điều hòa bởi các yếu tố sinh trưởng và hoạt tính của nó phụ thuộc vào môi trường tế bào và vùng khởi động ngược lại AF2 hoàn toàn phụ thuộc vào việc liên kết phối tử đối với hoạt tính. Mặc dù hai miền có thể tác động độc lập, hoạt tính phiên mã ER lớn nhất đạt được thông qua sự tương tác hiệp đồng thông qua hai miền này (Tzukerman, et al., Mol. Endocrinology, 1994, 8:21-30). Mặc dù ER được coi là yếu tố phiên mã chúng cũng có thể tác động thông qua các cơ chế không phải ở hệ gen như được chứng minh bởi tác dụng ER nhanh ở mô sau khi dùng E2 trong thang thời gian mà được coi là quá nhanh đối với tác động hệ gen. Vẫn không rõ ràng rằng liệu thụ thể chịu trách nhiệm đối với sự tác động nhanh của estrogen là các ER nhân giống nhau hay thụ thể steroit được ghép nối protein G riêng biệt (Warner, et al., Steroids 2006 71:91-95) nhưng số lượng tăng lên của các con đường cảm ứng E2 đã được xác định ví dụ như con đường MAPK/ERK và sự hoạt hóa của nitric oxit syntaza nội mạc và con đường PI3K/Akt. Ngoài các con đường phụ thuộc phối tử, ERα

đã được chứng minh là có hoạt tính không phụ thuộc phối tử thông qua AF-1 mà có liên quan đến sự kích thích của MAPK thông qua sự truyền tín hiệu yếu tố sinh trưởng ví dụ như yếu tố sinh trưởng giống insulin 1 (IGF-1) và yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF). Hoạt tính của AF-1 phụ thuộc vào sự phosphoryl hóa của Ser118 và ví dụ về sự nhiễu xuyên âm giữa ER và sự truyền tín hiệu yếu tố sinh trưởng là sự phosphoryl hóa của Ser 118 bởi MAPK khi đáp ứng với các yếu tố sinh trưởng chẳng hạn như IGF-1 và EGF (Kato, et al., Science, 1995, 270:1491-1494).

Số lượng lớn của các hợp chất khác biệt về cấu trúc đã được chứng minh là liên kết với ER. Một số hợp chất chẳng hạn như phối tử E2 nội sinh, tác động dưới dạng chất chủ vận thụ thể trong khi đó các chất khác ức chế cạnh tranh sự liên kết E2 và tác động dưới dạng chất đối kháng thụ thể. Các hợp chất này có thể được chia thành 2 lớp tùy thuộc vào tác dụng chức năng của chúng. Chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM) chẳng hạn như tamoxifen có khả năng tác động cả dưới dạng chất chủ vận và chất đối kháng thụ thể tùy thuộc vào bối cảnh tế bào và vùng khởi động cũng như là đồng phân ER được nhắm đích. Ví dụ như tamoxifen tác động dưới dạng chất đối kháng ở vú nhưng tác động dưới dạng chất chủ vận một phần ở xương, hệ tim mạch và tử cung. Tất cả các SERM dường như tác động dưới dạng chất đối kháng AF2 và có được đặc điểm chất chủ vận một phần của chúng thông qua AF1. Nhóm thứ hai, fulvestrant là một ví dụ, được phân loại là chất đối kháng đầy đủ và có khả năng phong bế hoạt tính estrogen thông qua sự ức chế hoàn toàn của các miền AF1 và AF2 thông qua sự cảm ứng của sự thay đổi hình dạng duy nhất trong miền liên kết phối tử (LBD) lên sự liên kết hợp chất mà dẫn đến sự triệt tiêu hoàn toàn của sự tương tác giữa xoắn 12 và phần còn lại của LBD, phong bế sự tuyển mộ đồng yếu tố (Wakeling, et al., Cancer Res., 1991, 51:3867-3873; Pike, et al., Structure, 2001, 9:145-153).

Hàm lượng nội bào của ERα được điều hòa giảm trong sự có mặt của E2 thông qua con đường ubiquitin/proteosom (Ub/26S). Sự polyubiquitinyl hóa của ER kết hợp phối tửα được xúc tác bằng ít nhất là ba enzym; ubiquitin được hoạt hóa bằng enzym hoạt hóa ubiquitin E1 được liên hợp bởi E2 với các gốc lysin thông qua liên kết isopeptit bằng E3 ubiquitin ligaza và sau đó ERα đã được polyubiquitin hóa được định hướng vào proteosom để phân hủy. Mặc dù sự điều

hòa phiên mã phụ thuộc ER và sự phân hủy qua trung gian proteosom của ER được kết nối (Lonard, et al., Mol. Cell, 2000 5:939-948), bản thân sự phiên mã không đòi hỏi sự phân hủy ERα và sự lắp ráp của phức hợp khởi đầu phiên mã là đủ để nhắm đích ERα cho sự phân hủy proteosom nhân. Quy trình phân hủy được cảm ứng bằng E2 này được cho là cần thiết đối với khả năng của nó để hoạt hóa nhanh chóng sự phiên mã khi đáp ứng với yêu cầu để tăng sinh, biệt hóa và trao đổi chất tế bào (Stenoien, et al., Mol. Cell Biol., 2001, 21:4404-4412). Fulvestrant cũng được phân loại là chất điều hòa giảm thụ thể estrogen chọn lọc (SERD), tập hợp con của chất đối kháng mà cũng có thể gây ra sự điều hòa giảm nhanh của ERα thông qua con đường proteosom 26S. Ngược lại SERM chẳng hạn như tamoxifen có thể làm tăng hàm lượng ERα mặc dù tác dụng lên sự phiên mã tương tự như tác dụng đã thấy được đối với SERD.

Xấp xỉ 70% bệnh ung thư vú biểu hiện ER và/hoặc thụ thể progesteron ngụ ý sự phụ thuộc hormon của các yếu tố phát triển khối u này. Các bệnh ung thư khác chẳng hạn như buồng trứng và nội mạc tử cung cũng được cho là phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu ERα để phát triển. Liệu pháp cho các bệnh nhân này có thể ức chế việc truyền tín hiệu ER bằng cách làm kháng việc liên kết phối tử với ER ví dụ như tamoxifen mà được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú dương tính ER sớm và tiến triển ở cả thiết lập trước và sau mãn kinh; làm đối kháng và điều hòa giảm ERα ví dụ như fulvestrant mà được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú ở phụ nữ mà đã tiết triển mặc dù có trị liệu bằng chất ức chế tamoxifen hoặc aromataza; hoặc phong bế sự tổng hợp estrogen ví dụ như chất ức chế aromataza mà được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú dương tính ER sớm và tiến triển. Mặc dù cá liệu pháp này có ảnh hưởng vô cùng tích cực lên việc điều trị bệnh ung thư vú, số lượng đáng kể của bệnh nhân mà có khối u biểu hiện ER thể hiện tính kháng de novo đối với các liệu pháp ER hiện nay hoặc phát triển tính kháng với các liệu pháp này theo thời gian. Một vài cơ chế khác nhau đã được mô tả để lý giải tính kháng đối với liệu pháp tamoxifen lần thứ nhất mà chủ yếu bao gồm sự chuyển đổi từ tamoxifen đóng vai trò làm chất đối kháng thành chất chủ vận, thông qua ái lực thấp của các đồng yếu tố nhất định liên kết với phức hợp tamoxifen-ERα được bù đắp bởi sự biểu hiện quá mức của các đồng yếu tố này,

hoặc thông qua sự tạo thành của các vị trí thứ cấp mà làm thuận tiện cho sự tương tác của phức hợp tamoxifen-ERα với các đồng yếu tố thường không liên kết với phức hợp. Do đó tính kháng có thể phát sinh dưới dạng kết quả của sự phát triển quá nhanh của tế bào biểu hiện các đồng yếu tố đặc hiệu mà mang lại hoạt tính tamoxifen-ERα. Cũng có khả năng là các con đường truyền tín hiệu yếu tố sinh trưởng khác trực tiếp hoạt hóa thụ thể ER hoặc chất đồng hoạt hóa để gây ra sự tăng sinh tế bào một cách độc lập của sự truyền tín hiệu phối tử.

Gần đây hơn, các đột biến ở ESR1 đã được xác định là cơ chế kháng có thể có ở mẫu khối u có nguồn gốc từ bệnh nhân dương tính ER di căn và mô hình ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX) ở tần suất thay đổi từ 17-25%. Các đột biến này phần lớn là, nhưng không loại trừ, trong miền liên kết phối tử dẫn đến protein chức năng đột biến; ví dụ về sự thay đổi axit amin bao gồm Ser463Pro, Val543Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn và Asp538Gly, với các thay đổi ở axit amin 537 và 538 cấu thành phần lớn của các thay đổi hiện đang được mô tả. Các đột biến này chưa được phát hiện trước đây trong hệ gen từ mẫu vú sơ cấp đặc trưng trong cơ sở dữ liệu Cancer Genome Atlas. Trong số 390 mẫu ung thư vú sơ cấp dương tính đối với sự biểu hiện ER không có đột biến đơn lẻ nào được phát hiện ở ESR1 (Cancer Genome Atlas Network, 2012 Nature 490: 61-70). Các đột biến miền liên kết phối tử được cho là đã phát triển dưới dạng đáp ứng kháng đối với liệu pháp nội tiết chất ức chế aromataza vì các thụ thể đột biến này thể hiện hoạt tính phiên mã cơ bản khi không có mặt estradiol. Cấu trúc tinh thể của ER, đột biến ở các axit amin 537 và 538, cho thấy rằng cả hai thể đột biến thiên về cấu hình chất chủ vận của ER bằng cách dịch chuyển vị trí của xoắn 12 để cho phép tuyển mộ chất đồng hoạt hóa và bằng cách đó bắt chước ER kiểu dại được hoạt hóa bằng chất chủ vận. Dữ liệu đã công bố cho thấy rằng liệu pháp nội tiết chẳng hạn như tamoxifen và fulvestrant có thể vẫn liên kết với thể đột biến ER và ức chế sự hoạt hóa phiên mã đến mức độ nào đó và fulvestrant có khả năng làm thoái biến Try537Ser nhưng có thể cần liều lượng cao hơn để ức chế thụ thể hoàn toàn (Toy et al., Nat. Genetics 2013, 45: 1439-1445; Robinson et al., Nat. Genetics 2013, 45: 144601451; Li, S. et al. Cell Rep. 4, 1116–1130 (2013). Do đó điều khả thi là các hợp chất nhất định có công thức (I) hoặc muối dược dụng của

chúng (như được mô tả dưới đây) sẽ có khả năng điều hòa giảm và đối kháng ER đột biến mặc dù chưa biết được là ở giai đoạn này các đột biến ESR1 có liên quan đến kết quả lâm sàng thay đổi hay không.

Bất kể cơ chế kháng nào hoặc dạng kết hợp của các cơ chế diễn ra, nhiều cơ chế vẫn dựa vào hoạt tính phụ thuộc ER và sự loại bỏ của thụ thể thông qua cơ chế SERD đưa ra cách tốt nhất để loại bỏ thụ thể ERα khỏi tế bào. Fulvestrant hiện đang là SERD duy nhất được phê chuẩn để sử dụng lâm sàng, dù chưa biết tính chất cơ học của nó, tính chất dược lý của thuốc làm hạn chế hiệu quả của nó do giới hạn hiện tại của liều lượng hàng tháng 500mg mà dẫn đến sự luân chuyển ít hơn 50% của thụ thể ở mẫu bệnh nhân so với sự điều hòa giảm hoàn toàn của thụ thể thấy được trong thí nghiệm dòng tế bào vú *in vitro* (Wardell, et al., Biochem. Pharm., 2011, 82:122-130). Do đó có nhu cầu về tác nhân nhắm đích ER mới mà có tính chất dược yêu cầu và cơ chế SERD để mang lại lợi ích tăng cường trong thiết lập tính kháng sớm, di căn và mắc phải.

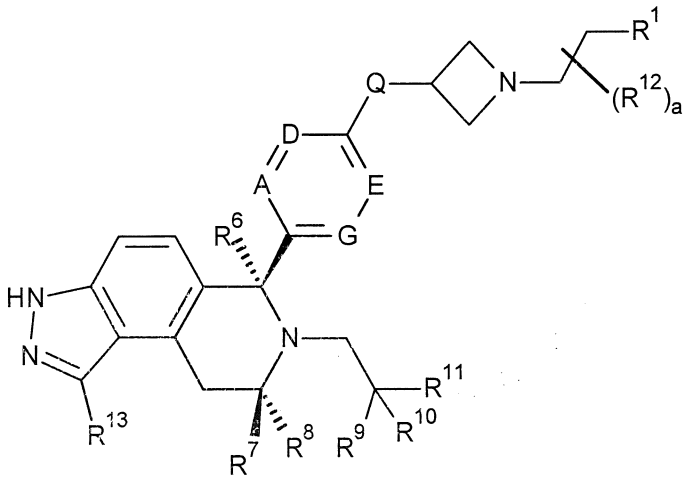
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các hợp chất theo sáng chế đã được phát hiện là mang hoạt tính kháng khối u có hiệu lực, hữu dụng trong việc ức chế sự tăng sinh tế bào mất kiểm soát mà phát sinh từ bệnh ác tính. Các hợp chất theo sáng chế tạo ra hiệu quả kháng khối u bằng cách, tối thiểu là, đóng vai trò làm SERD. Ví dụ như, các hợp chất theo sáng chế có thể thể hiện hoạt tính kháng khối u thông qua khả năng để điều hòa giảm thụ thể estrogen ở một số dòng tế bào ung thư vú khác nhau, ví dụ như chống lại các dòng tế bào ung thư vú MCF-7, CAMA-1, BT474 và/hoặc MDA-MB-134. Các hợp chất này có thể được kỳ vọng là thích hợp hơn làm tác nhân trị liệu, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư.

Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể thể hiện các tính chất vật lý có lợi (ví dụ như, độ ưa lipit thấp hơn, khả năng hòa tan trong nước cao hơn, khả năng thấm cao hơn, sự liên kết protein huyết tương thấp hơn, và/hoặc độ ổn định hóa học lớn hơn), và/hoặc biên dạng gây độc hứa hẹn (ví dụ như hoạt tính giảm ở hERG), và/hoặc biên dạng chuyển hóa hoặc dược động học hứa hẹn, so với SERD đã biết khác. Do đó các hợp chất này có thể đặc biệt thích hợp làm tác nhân trị

liệu, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư.

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



(I)

trong đó:

A là CR^2 hoặc N;

G là CR^3 hoặc N;

D là CR^4 hoặc N;

E là CR^5 hoặc N;

Q là O, NH hoặc NMe;

R^1 là CH_2F, CHF_2 hoặc CF_3;

R^2 là H, F, Cl, Me, CN, OMe hoặc OEt;

R^3 là H hoặc F;

R^4 là H, F, CN hoặc OMe;

R^5 là H hoặc F;

R^6 là H, Me, CH_2F, CHF_2 hoặc CF_3;

R^7 là H hoặc Me;

R^8 là C_{1-3} alkyl, CH_2F, CHF_2, CF_3 hoặc C_{3-4} xycloalkyl;

R^9 là Me, F hoặc CH_2F;

R^{10} là Me, F, CH_2F, CHF_2, CF_3, CH_2OMe hoặc CH_2OH;

R^{11} là H hoặc F; hoặc

R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng

xyclopropyl hoặc vòng oxetan;

R^{12} độc lập được chọn từ F hoặc Me;

R^{13} là H hoặc F; và

a bằng 0, 1 hoặc 2;

hoặc muối dược dụng của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với tá dược dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng, để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm kết hợp của hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng, với chất kháng khối u khác, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng A của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 2 thể hiện Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng A của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 3 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng B của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 4 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng C của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 5 thể hiện Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng C của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 6 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng D của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 7 thể hiện Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng D của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 8 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng E của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 9 thể hiện Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng E của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 10 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng F của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 11 thể hiện mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng G của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 12 thể hiện kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài MCF7 gốc người ở chuột bằng *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 13 thể hiện kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài MCF7 đột biến Y537S ESR1 của người ở chuột bằng *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 14 thể hiện kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài CTC174 có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người ở chuột bằng *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin.

Hình 15 thể hiện kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép

khác loài CTC174 có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người ở chuột bằng dược phẩm kết hợp của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin và palbociclib.

Hình 16 thể hiện kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài CTC174 có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người ở chuột bằng dược phẩm kết hợp của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin và vistusertib (AZD2014).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực khi đọc bản mô tả này.

Nhóm C_{1-3} alkyl có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Ví dụ về nhóm C_{1-3} alkyl thích hợp là metyl (Me), etyl (Et), n-propyl (n-Pr) hoặc i-propyl (i-Pr).

Nhóm C_{3-4} xycloalkyl là vòng carboxyclic không được thế, đơn vòng, chưa no. Ví dụ về nhóm C_{3-4} xycloalkyl thích hợp là xyclopropyl và xyclobutyl.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) như xác định ở trên.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất muối dược dụng của hợp chất có công thức (I).

Theo một phương án A là CR^2.

Theo một phương án G là CR^3.

Theo một phương án A là CR^2 và G là CR^3.

Theo một phương án A là CR^2 và G là N.

Theo một phương án A là N và G là CR^3.

Theo một phương án R^2 là H, F, Cl, Me, CN hoặc OMe.

Theo một phương án R^2 là H, F hoặc OMe.

Theo một phương án R^2 là H hoặc F.

Theo một phương án R^2 là H.

Theo một phương án R^2 là F.

Theo một phương án A là CR^2 và R^2 là H, F hoặc OMe.

Theo một phương án G là CR^3 và R^3 là H, F hoặc OMe.

Theo một phương án A là CH và G là CH.

Theo một phương án A là C-F và G là C-F.

Theo một phương án A là C-F và G là CH.

Theo một phương án A là C-OMe và G là CH.

Theo một phương án A là C-OMe và G là C-F.

Theo một phương án một trong số A hoặc G là CH và thành phần kia trong số A hoặc G là N.

Theo một phương án D là CR^4.

Theo một phương án E là CR^5.

Theo một phương án cả D và E đều là CH.

Theo một phương án cả D và E đều là N.

Theo một phương án một trong số D hoặc E là CH và thành phần kia trong số D hoặc E là N.

Theo một phương án một trong số D hoặc E là C-F và thành phần kia trong số D hoặc E là CH.

Theo một phương án một trong số D hoặc E là C-OMe và thành phần kia trong số D hoặc E là CH.

Theo một phương án Q là O hoặc NH.

Theo một phương án Q là O.

Theo một phương án Q là NH.

Theo một phương án Q là NMe.

Theo một phương án R^1 là CH_2F hoặc CHF_2.

Theo một phương án R^1 là CH_2F.

Theo một phương án R^1 là CHF_2.

Theo một phương án R^1 là CF_3.

Theo một phương án R^6 là H hoặc Me.

Theo một phương án R^6 là H.

Theo một phương án R^6 là Me.

Theo một phương án R^7 là H.

Theo một phương án R^7 là Me.

Theo một phương án R^8 là C_{1-3} alkyl, CHF_2 hoặc xyclopropyl.

Theo một phương án R^8 là C_{1-3} alkyl hoặc CHF_2.

Theo một phương án R^8 là C_{1-3} alkyl.

Theo một phương án R^8 là metyl.

Theo một phương án R^8 là CHF_2.

Theo một phương án R^9 là Me hoặc F.

Theo một phương án R^9 là Me.

Theo một phương án R^9 là F.

Theo một phương án R^{10} là Me, F, CH_2F, CH_2OMe hoặc CH_2OH.

Theo một phương án R^{10} là Me, F, CH_2OMe hoặc CH_2OH.

Theo một phương án R^{10} là F, CH_2OMe hoặc CH_2OH.

Theo một phương án R^{10} là CH_2OMe hoặc CH_2OH.

Theo một phương án R^{10} là F.

Theo một phương án R^{11} là F.

Theo một phương án R^{11} là H.

Theo một phương án R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl hoặc vòng oxetan.

Theo một phương án R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl.

Theo một phương án R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng oxetan.

Theo một phương án R^{10} là CH_2OMe hoặc CH_2OH và R^{11} là F.

Theo một phương án R^{10} là CH_2OMe hoặc CH_2OH và R^9 là Me.

Theo một phương án R^{10} là F và R^9 là F.

Theo một phương án R^9 là Me hoặc F và R^2 là H, F, Cl, Me, CN hoặc OMe.

Theo một phương án R^9 là Me và R^{11} là F.

Theo một phương án R^9 là F và R^{11} là Me.

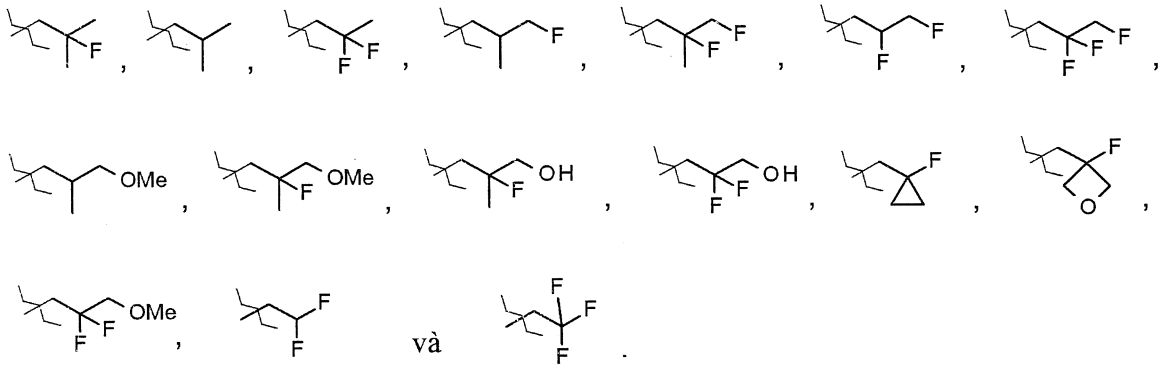
Theo một phương án R^9 là F và R^{11} là F.

Theo một phương án R^9 là F và R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl hoặc vòng oxetan.

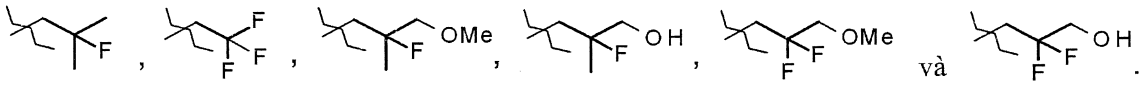
Theo một phương án R^9 là F và R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl.

Theo một phương án R^9 là F và R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng oxetan.

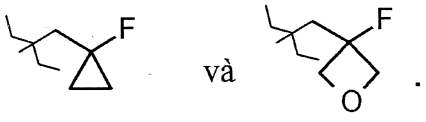
Theo một phương án, nhóm $-CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:



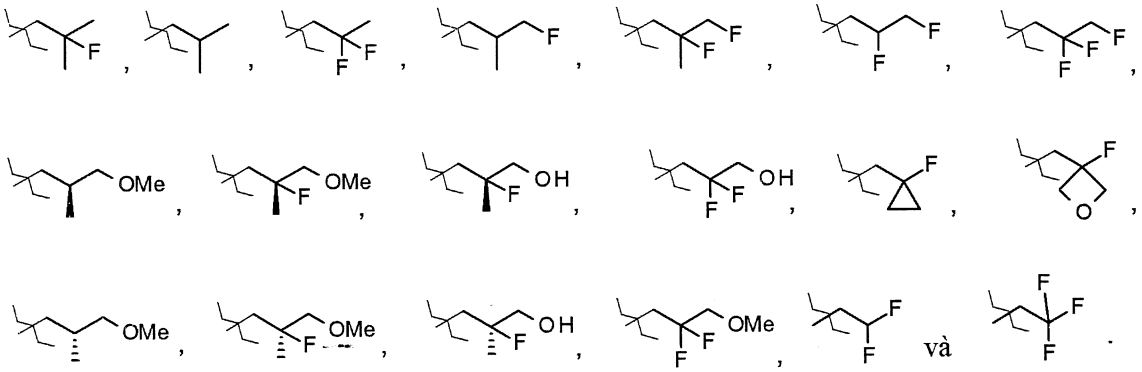
Theo một phương án, nhóm $-CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:



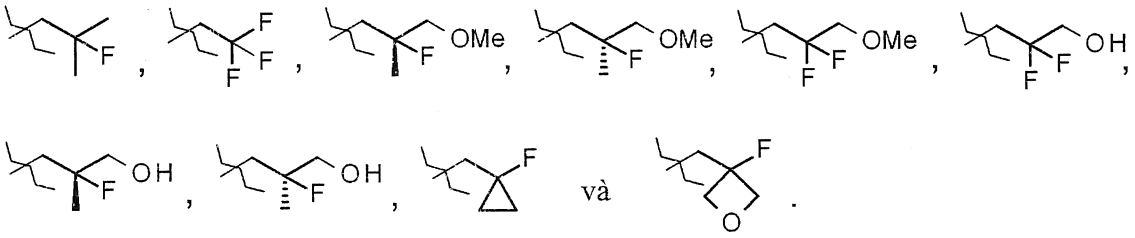
Theo một phương án, nhóm $-CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:



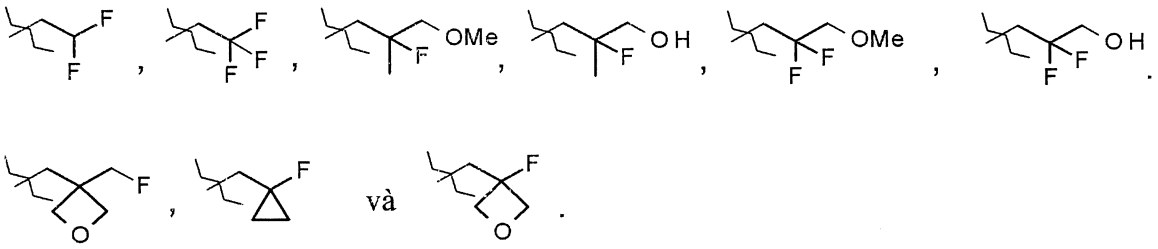
Theo một phương án, nhóm $-CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, nhóm $-CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, nhóm $-CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (I) được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án R^{12} là Me.

Theo một phương án R^{12} là F.

Theo một phương án R^{13} là H.

Theo một phương án R^{13} là F.

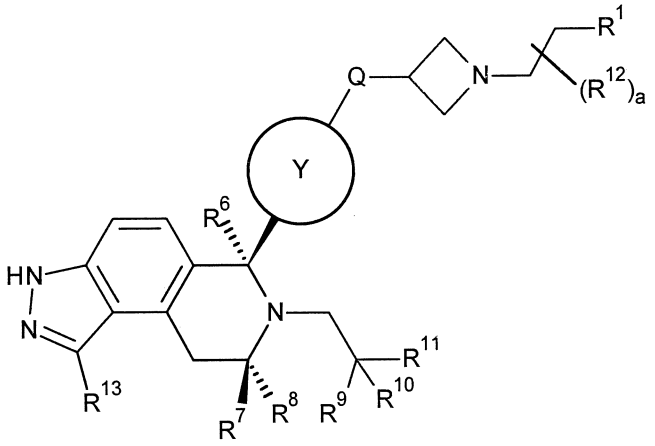
Theo một phương án a bằng 0 hoặc 1.

Theo một phương án a bằng 0.

Theo một phương án a bằng 1.

Theo một phương án a bằng 2.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA):



(IA)

trong đó:

Q là O, NH hoặc NMe;

R^1 là CH_2F, CHF_2 hoặc CF_3;

R^6 là H hoặc Me;

R^7 là H hoặc Me;

R^8 là Me, CHF_2 hoặc xyclopropyl;

R^9 là Me hoặc F;

R^{10} là Me, F, CH_2F, CH_2OMe hoặc CH_2OH;

R^{11} là H hoặc F; hoặc

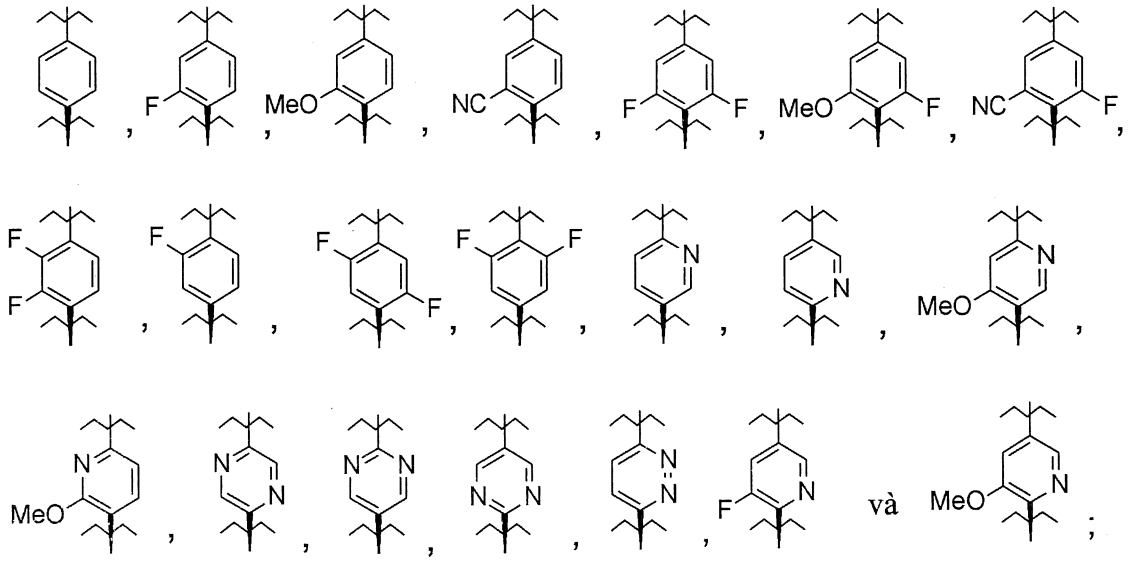
R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl hoặc vòng oxetan;

R^{12} độc lập được chọn từ H hoặc Me;

R^{13} là H hoặc F;

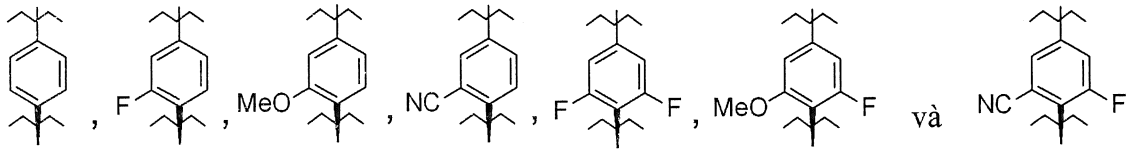
a bằng 0, 1 hoặc 2; và

Vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:

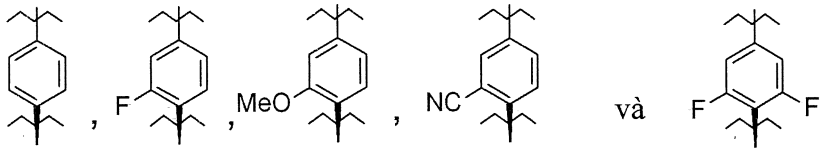


hoặc muối dược dụng của chúng.

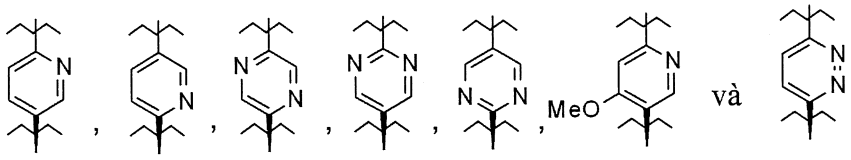
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



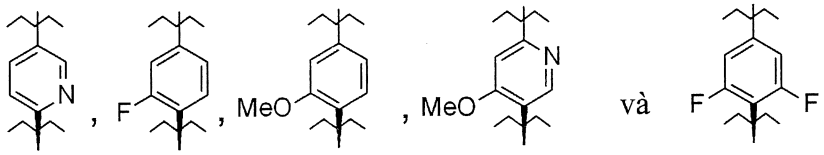
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



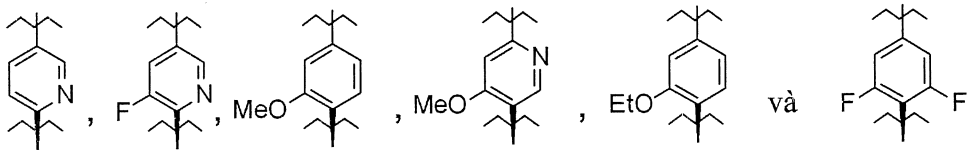
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là NH.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là O.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^1 là CH_2F.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^1 là CHF_2.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^6 là H.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^7 là H.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^8 là Me.

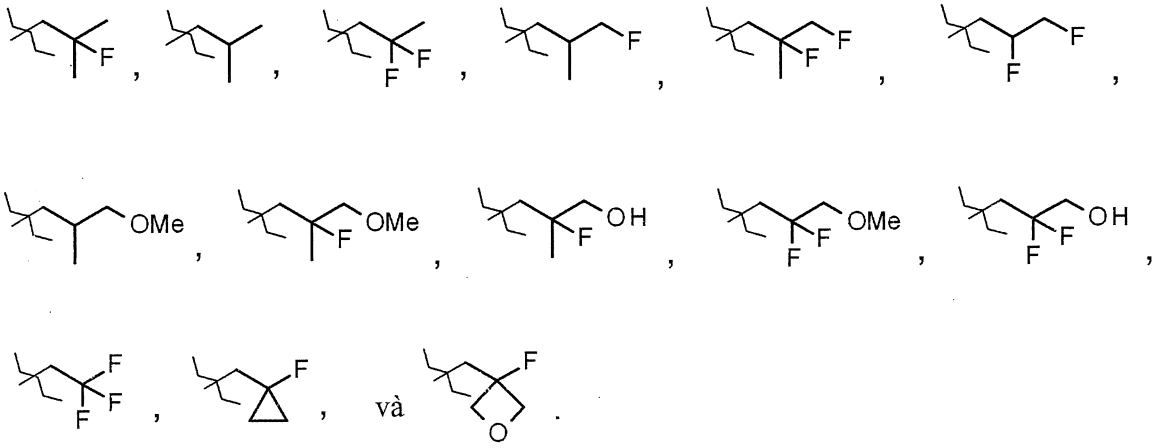
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^{10} là F, CH_2OMe hoặc CH_2OH.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^9 là F và R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl hoặc vòng oxetan. Theo phương án khác R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl. Theo phương án khác R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng oxetan.

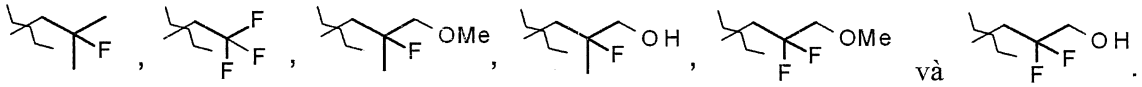
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc

muối dược dụng của chúng, trong đó R^8 là Me.

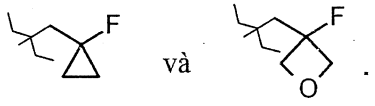
Theo một phương án, nhóm $–CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (IA) được chọn từ nhóm gồm có:



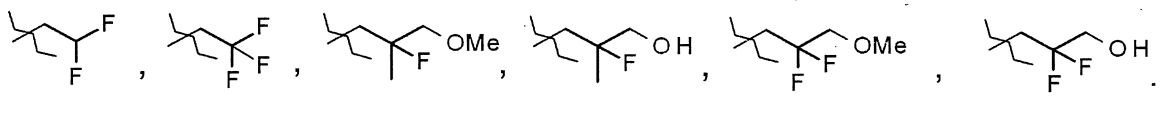
Theo một phương án, nhóm $–CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (IA) được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, nhóm $–CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (IA) được chọn từ nhóm gồm có:



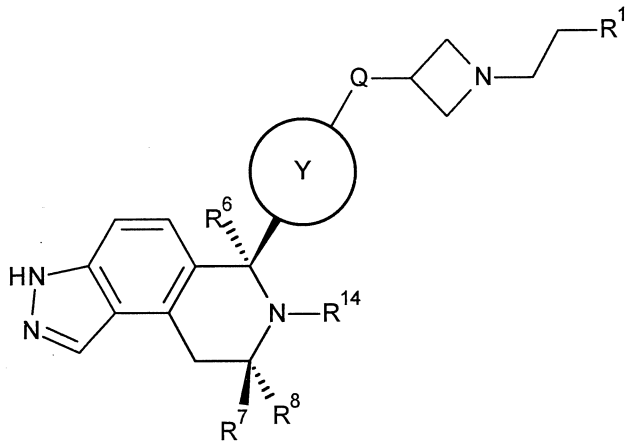
Theo một phương án, nhóm $–CH_2-C(R^9)(R^{10})(R^{11})$ trong hợp chất có công thức (IA) được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^{13} là H.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IA), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó a bằng 0.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB):



(IB)

trong đó:

Q là O, NH hoặc NMe;

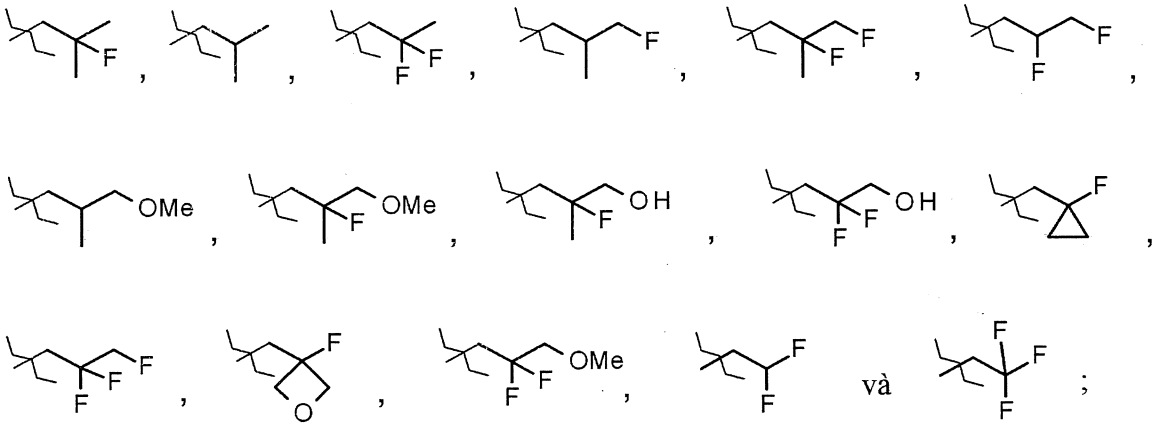
R^1 là CH_2F, CHF_2 hoặc CF_3;

R^6 là H hoặc Me;

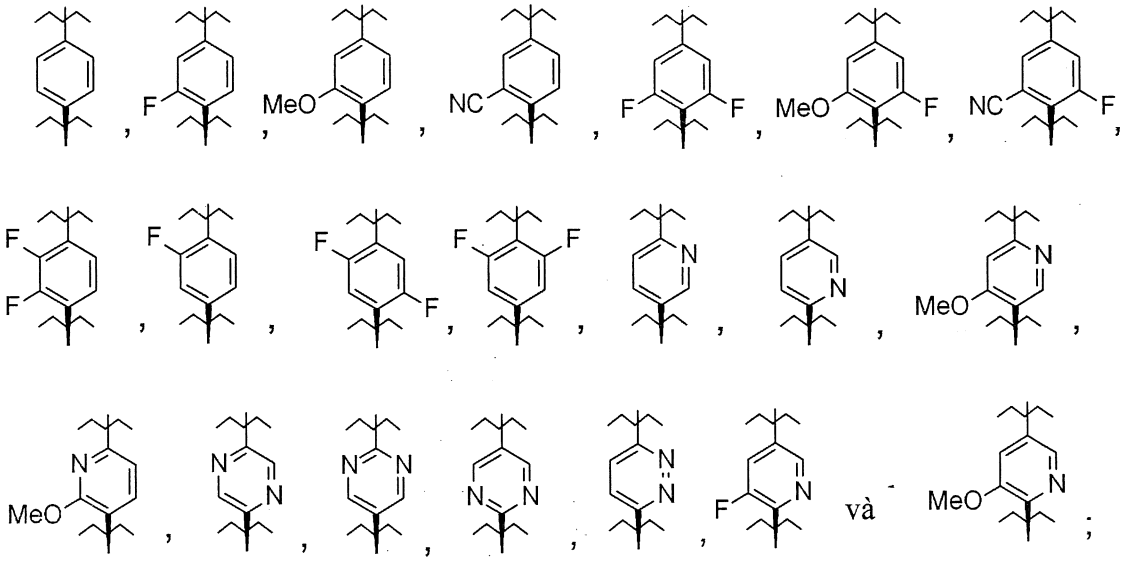
R^7 là H hoặc Me;

R^8 là Me, CHF_2 hoặc xyclopropyl;

R^{14} được chọn từ nhóm gồm có:

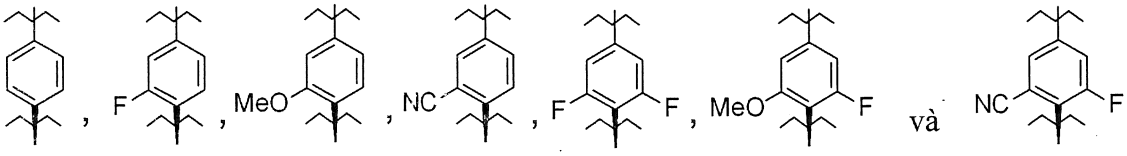


và vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:

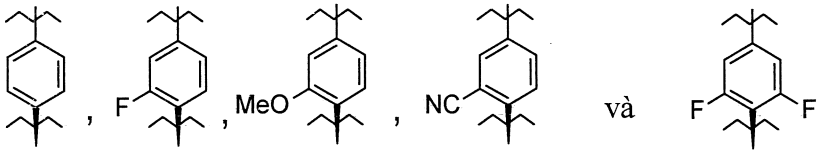


hoặc muối dược dụng của chúng.

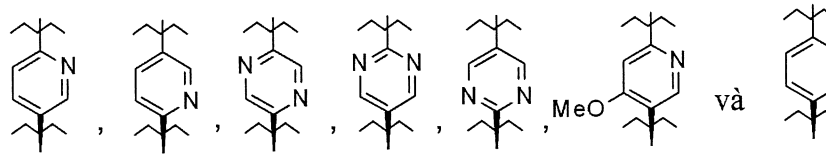
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



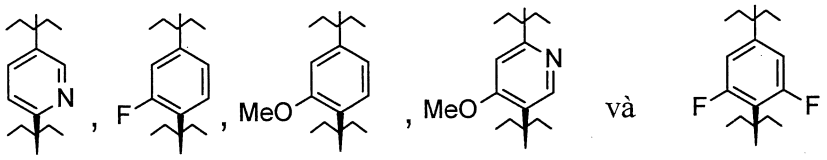
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



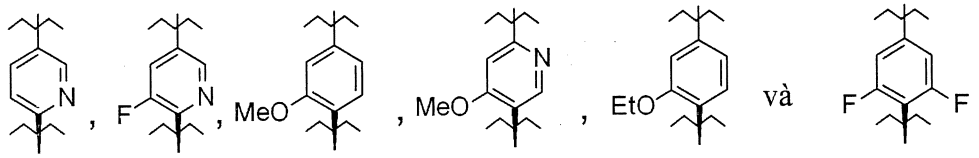
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là NH.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là O.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^1 là CH_2F.

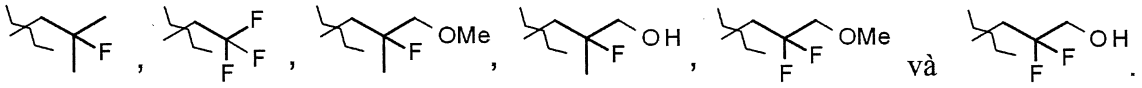
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^1 là CHF_2.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^6 là H.

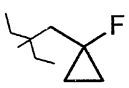
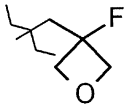
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^7 là H.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IB), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^8 là Me.

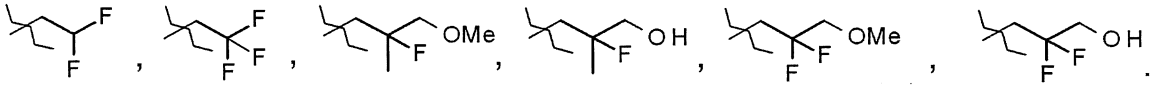
Theo một phương án, nhóm R^{14} trong hợp chất có công thức (IB) được chọn từ nhóm gồm có:

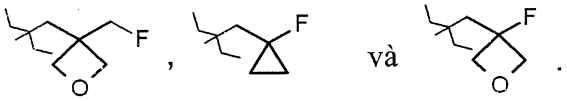


Theo một phương án, nhóm R^{14} trong hợp chất có công thức (IB) được chọn từ nhóm gồm có:

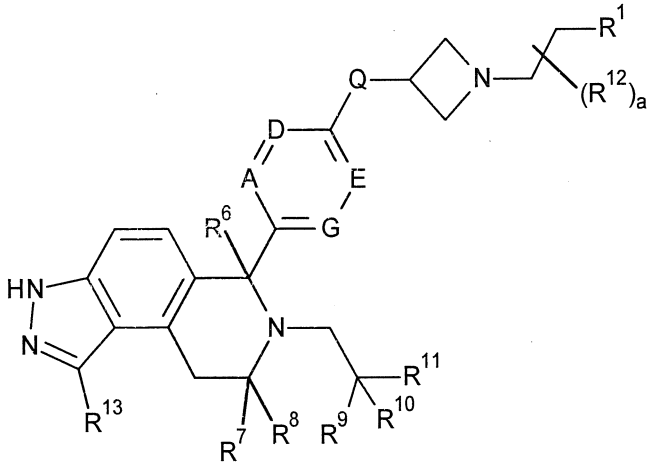
 và  .

Theo một phương án, nhóm R^{14} trong hợp chất có công thức (IB) được chọn từ nhóm gồm có:





Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IC):



(IC)

trong đó:

A là CR^2 hoặc N;

G là CR^3 hoặc N;

D là CR^4 hoặc N;

E là CR^5 hoặc N;

Q là O, NH hoặc NMe;

R^1 là CH_2F, CHF_2 hoặc CF_3;

R^2 là H, F, Cl, Me, CN, OMe hoặc OEt;

R^3 là H hoặc F;

R^4 là H, F, CN hoặc OMe;

R^5 là H hoặc F;

R^6 là H, Me, CH_2F, CHF_2 hoặc CF_3;

R^7 là H hoặc Me;

R^8 là C_{1-3} alkyl, CH_2F, CHF_2, CF_3 hoặc C_{3-4} xycloalkyl;

R^9 là Me, F hoặc CH_2F;

R^{10} là Me, F, CH_2F, CHF_2, CF_3, CH_2OMe hoặc CH_2OH;

R^{11} là H hoặc F; hoặc

R^{10} và R^{11} cùng với nguyên tử cacbon mà chúng gắn vào tạo thành vòng xyclopropyl hoặc vòng oxetan;

R^{12} độc lập được chọn từ F hoặc Me;

R^{13} là H hoặc F; và

a bằng 0, 1 hoặc 2;

hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IC) hoặc muối dược dụng của chúng trong đó R^2 là H, F, Cl, Me, CN hoặc OMe và R^9 là Me hoặc F.

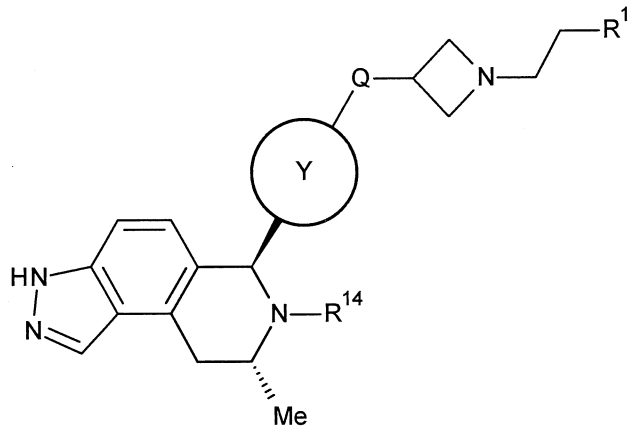
Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IC) hoặc muối dược dụng của chúng trong đó hóa học lập thể ở vị trí 6 của vòng pyrazolo[4,3-f]isoquinolin là S.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IC) hoặc muối dược dụng của chúng trong đó hóa học lập thể ở vị trí 6 của vòng pyrazolo[4,3-f]isoquinolin là R.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IC) hoặc muối dược dụng của chúng trong đó hóa học lập thể ở vị trí 8 của vòng pyrazolo[4,3-f]isoquinolin là S.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (IC) hoặc muối dược dụng của chúng trong đó hóa học lập thể ở vị trí 8 của vòng pyrazolo[4,3-f]isoquinolin là R.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID):



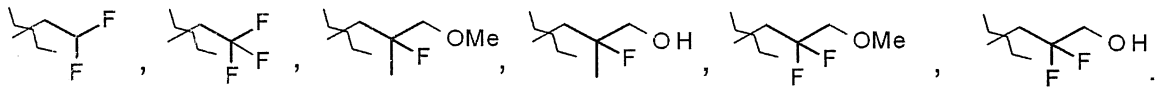
(ID)

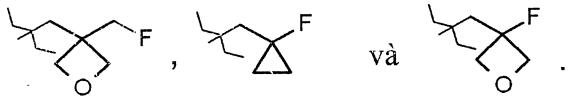
trong đó:

Q là O hoặc NH;

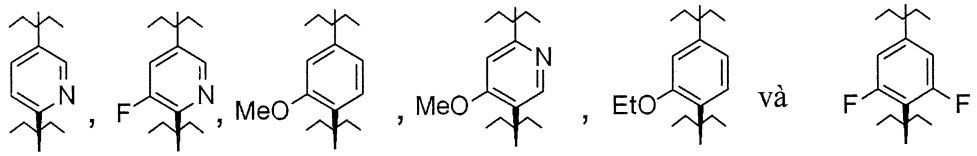
R^1 là CH_2F hoặc CHF_2;

R^{14} được chọn từ nhóm gồm có:





và vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là NH.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là O.

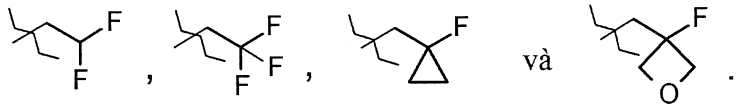
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^1 là CH_2F.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó Q là O và R^1 là CH_2F.

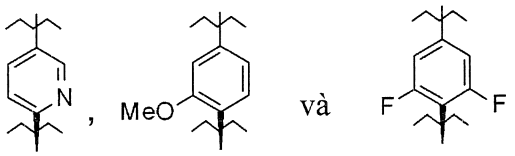
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc

muối dược dụng của chúng, trong đó Q là NH và R^1 là CH_2F.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó R^{14} được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), trong đó hợp chất được chọn từ nhóm gồm có:

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)phenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)-2,2-điflopropan-1-ol;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

(6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;

N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin; và

5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin;

hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), trong đó hợp chất được chọn từ nhóm gồm có:

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)phenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)-2,2-điflopropan-1-ol;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

(6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;

N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-

3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
(6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-6-(4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin;
N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;
N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;
5-flo-6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;
N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
N-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
(6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;
3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-ylamino)phenyl)-8-metyl-8,9-đihyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-7(6*H*)-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-ol;
6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin; và
(6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;
hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), trong đó hợp chất được chọn từ nhóm gồm có:
1-(3-flopropyl)-*N*-(4-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin;

1-(3-flopropyl)-*N*-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin;

2-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

6-((6S, 8R)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,9,8-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquin-6-yl)-N-(3-flopropyl)azetiđi-3-yl)pyriđin-3-amin;

5-flo-6-((6*S*,8*R*)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-N-metyl-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-6-đoteri-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-1-đoteri-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-5-metoxy-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

5-((6S,8R)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyrazin-2-amin;

2-flo-6-((6S,8R)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

6-flo-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-5-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-2-amin;

N-(2-flo-4-((6R,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-5-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyrazin-2-amin;

6-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-

f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-N-metylpyriđin-3-amin;
6-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-6,8-đimetyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;
N-(4-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-6,8-đimetyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
6-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-flo-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;
6-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-2-flo-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;
N-(4-((6R,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
N-(4-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
5-((6S,8R)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyrazin-2-amin;
6-((6S,8S)-7-(2,2-đifloetyl)-8-(điflometyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;
N-(4-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)-N-metylazetiđin-3-amin;
N-(2-flo-4-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;
5-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-2-amin;
5-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyrazin-2-amin;
N-(4-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3,3,3-triflopropyl)azetiđin-3-amin;
6-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-

pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-N-metylpyriđin-3-amin;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-1-flo-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-1-flo-6-(6-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

6-((6S,8R)-7-(2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

N-(4-((6S,8R)-7-(2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

6-((6S,8R)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

6-((6S,8R)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

1-(3-flopropyl)-N-(4-((6S,8R)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin;

1-(3-flopropyl)-N-(4-((6S,8R)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-7-isobutyl-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

6-((6S,8R)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

5-flo-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,3-triflopropyl)-

6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;
(S)-6-(8,8-đimetyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin; và
(S)-6-(7-(2,2-đifloetyl)-8,8-đimetyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin
hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) mà là *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-(8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin, hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) mà được chọn từ nhóm gồm có:
N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin; và
N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;
hoặc muối dược dụng của chúng.

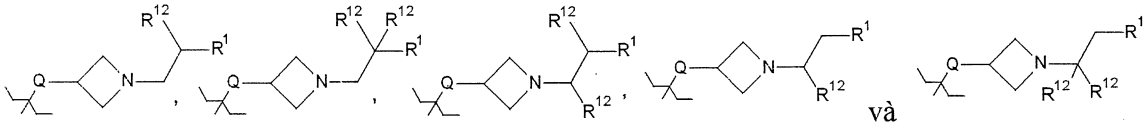
Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) mà là *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin, hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) mà là *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin, hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất được chọn từ ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ trong sáng chế. Dấu hiệu khác nữa là phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả trong sáng chế với điều kiện là ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể được loại trừ riêng rẽ. Dấu hiệu khác nữa là phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả trong sáng chế với điều kiện là một hoặc nhiều hợp

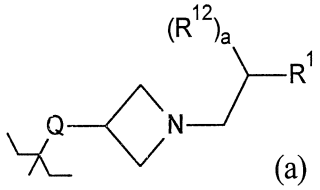
chất bất kỳ trong số các hợp chất được chọn từ danh sách nêu trên của các ví dụ của các hợp chất theo sáng chế được loại trừ riêng rẽ.

Để cho rõ ràng, khi a bằng 1, phần tử thế R^{12} có thể được thế trên một trong hai cacbon của chuỗi etyl tương ứng mà nó được kết hợp với, và khi a bằng 2, phần tử thế R^{12} có thể được thế ở một trong hai cacbon đơn lẻ hoặc ở cả hai cacbon của chuỗi etyl đó. Do đó, khi a bằng 1 hoặc 2, các kiểu thế sau đây có thể được, mỗi kiểu thế này thể hiện một phương án khác:



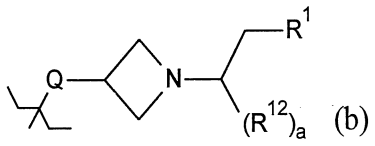
(i) (ii) (iii) (iv) và (v)

Do đó, theo phương án khác, a bằng 1 hoặc 2 và R^{12} được gắn vào phần còn lại của hợp chất có công thức (I) như được thể hiện trong mục (a) dưới đây:



(a),

Theo phương án khác, a bằng 1 hoặc 2, R^{12} là metyl, và R^{12} được gắn vào phần còn lại của hợp chất có công thức (I) như được thể hiện trong mục (b) dưới đây:



(b),

Để cho rõ ràng hơn, việc sử dụng " ⟋⟍ " trong các công thức của bản mô tả này chỉ ra điểm gắn giữa các nhóm khác nhau.

Các hợp chất có công thức (I) có hai hoặc hơn hai tâm bất đối xứng và sẽ nhận ra rằng hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế, được phân lập và/hoặc được cung cấp với sự có mặt hoặc không có mặt, ngoài ra, của một hoặc nhiều chất đồng phân đối ảnh và/hoặc chất đồng phân không đối quang có thể có khác của hợp chất có công thức (I) ở tỉ lệ tương đối bất kỳ. Việc điều chế hợp chất được làm giàu đồng phân đối ảnh/ tinh khiết về đồng phân đối ảnh và/hoặc được làm giàu đồng phân không đối quang/tinh khiết về đồng phân không đối quang có

thể được thực hiện bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn của hóa học hữu cơ mà đã được biết rõ trong lĩnh vực, ví dụ bằng cách tổng hợp từ nguyên liệu bắt đầu được làm giàu đồng phân đối ảnh hoặc tinh khiết về đồng phân đối ảnh, việc sử dụng chất xúc tác được làm giàu đồng phân đối ảnh hoặc tinh khiết về đồng phân đối ảnh thích hợp trong quá trình tổng hợp, và/hoặc bằng cách phân giải hỗn hợp triệt quang hoặc được làm giàu một phần của chất đồng phân lập thể, ví dụ thông qua sắc ký bất đối xứng.

Để sử dụng trong lĩnh vực dược có thể ưu tiên đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng mà không có lượng lớn của các dạng đồng phân lập thể khác có mặt.

Theo đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp phần có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, tùy ý cùng với một hoặc nhiều dạng đồng phân lập thể khác của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có mặt trong hợp phần với độ dôi đồng phân không đối quang (%de) bằng ≥ 90%.

Theo phương án khác %de trong hợp phần nêu trên là ≥ 95%.

Theo phương án khác %de trong hợp phần nêu trên là ≥ 98%.

Theo phương án khác %de trong hợp phần nêu trên là ≥ 99%.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp phần có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, tùy ý cùng với một hoặc nhiều dạng đồng phân lập thể khác của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có mặt trong hợp phần với độ dôi đồng phân đối ảnh (%ee) bằng ≥ 90%.

Theo phương án khác %ee trong hợp phần nêu trên là ≥ 95%.

Theo phương án khác %ee trong hợp phần nêu trên là ≥ 98%.

Theo phương án khác %ee trong hợp phần nêu trên là ≥ 99%.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp phần có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, tùy ý cùng với một hoặc nhiều dạng đồng phân lập thể khác của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có mặt

trong hợp phần với độ dôi đồng phân đối ảnh (%ee) bằng ≥ 90% và độ dôi đồng phân không đối quang (%de) bằng ≥ 90%.

Theo các phương án khác của hợp phần nêu trên %ee và %de có thể ở dạng kết hợp bất kỳ của các giá trị như liệt kê dưới đây:

- %ee bằng ≤5% và %de bằng ≥ 80%.
- %ee bằng ≤5% và %de bằng ≥ 90%.
- %ee bằng ≤5% và %de bằng ≥ 95%.
- %ee bằng ≤5% và %de bằng ≥ 98%.
- %ee bằng ≥ 95% và %de bằng ≥ 95%.
- %ee bằng ≥ 98% và %de bằng ≥ 98%.
- %ee bằng ≥ 99% và %de bằng ≥ 99%.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với tá dược dược dụng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với tá dược dược dụng, tùy ý còn chứa một hoặc nhiều dạng đồng phân lập thể khác của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có mặt trong hợp phần với độ dôi đồng phân đối ảnh (%ee) bằng ≥ 90%.

Theo phương án khác %ee trong hợp phần nêu trên là ≥ 95%.

Theo phương án khác %ee trong hợp phần nêu trên là ≥ 98%.

Theo phương án khác %ee trong hợp phần nêu trên là ≥ 99%.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với tá dược dược dụng, tùy ý còn chứa một hoặc nhiều dạng đồng phân lập thể khác của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có mặt trong hợp phần với độ dôi đồng phân không đối quang (%de) bằng ≥ 90%.

Theo phương án khác %de trong hợp phần nêu trên là ≥ 95%.

Theo phương án khác %de trong hợp phần nêu trên là ≥ 98%.

Theo phương án khác %de trong hợp phần nêu trên là ≥ 99%.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với tá dược dược dụng, tùy ý còn chứa một hoặc nhiều dạng đồng phân lập thể khác của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có mặt trong hợp phần với độ dôi đồng phân đối ảnh (%ee) bằng ≥ 90% và độ dôi đồng phân không đối quang (%de) bằng ≥ 90%.

Theo các phương án khác của dược phẩm nêu trên %ee và %de có thể ở dạng kết hợp bất kỳ của các giá trị như liệt kê dưới đây:

- %ee bằng ≥ 95% và %de bằng ≥ 95%.
- %ee bằng ≥ 98% và %de bằng ≥ 98%.
- %ee bằng ≥ 99% và %de bằng ≥ 99%.

Các hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng có thể được điều chế, được sử dụng hoặc được cung cấp ở dạng vô định hình, dạng kết tinh, hoặc dạng bán kết tinh và hợp chất nhất định bất kỳ có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có thể có khả năng được tạo thành hơn một dạng kết tinh / đa hình, bao gồm hyđrat hóa (ví dụ như bán hyđrat, mono-hyđrat, đi-hyđrat, tri-hyđrat hoặc hóa học lượng pháp khác của hyđrat) và/hoặc dạng solvat hóa. Cần hiểu rằng sáng chế này bao hàm dạng rắn như vậy bất kỳ và tất cả các dạng rắn như vậy của hợp chất có công thức (I) và muối dược dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), mà thu được bằng phương pháp được mô tả trong phần 'Ví dụ thực hiện sáng chế' dưới đây.

Sáng chế được dự định là bao gồm tất cả các chất đồng vị của các nguyên tử có mặt trong hợp chất này. Cần hiểu rằng chất đồng vị bao gồm các nguyên tử có cùng số nguyên tử nhưng có số khối khác. Ví dụ, các đồng vị của hyđro bao gồm triti và đơteri. Các đồng vị của cacbon bao gồm ^{13}C và ^{14}C. Các đồng vị của nitơ bao gồm ^{15}N. Theo phương án cụ thể sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) trong đó R^6 là đơteri.

Muối dược dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) là, ví dụ, muối cộng axit. Muối dược dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) có thể là, ví dụ

như, muối cộng axit của hợp chất có công thức (I), ví dụ như muối cộng axit với axit vô cơ hoặc hữu cơ chẳng hạn như axit axetic, axit adipic, axit benzen sulfonic, axit benzoic, axit xinamic, axit xitric, axit D,L-lactic, axit etan đisulfonic, axit etan sulfonic, axit fumaric, axit clohyđric, axit L-tartaric, axit maleic, axit malic, axit malonic, axit metan sulfonic, axit napađisylic, axit phosphoric, saccharin, axit sucxinic, axit sulfuric, axit *p*-toluensulfonic, axit toluen sulfonic hoặc axit trifloaxetic.

Muối dược dụng thích hợp khác của hợp chất có công thức (I) là, ví dụ, muối tạo thành ở trong cơ thể người hoặc động vật sau khi dùng hợp chất có công thức (I) cho cơ thể của người hoặc động vật này.

Hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng có thể được điều chế dưới dạng dạng rắn đồng tinh thể. Cần hiểu rằng đồng tinh thể dược dụng của hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng, tạo thành một khía cạnh của sáng chế này.

Dạng rắn cụ thể được mô tả trong bản mô tả này tạo ra các mẫu nhiễu xạ bột tia X về cơ bản giống như các mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên các Hình vẽ và có các giá trị 2-teta khác nhau như được thể hiện trong các Bảng được bao gồm trong bản mô tả này. Cần hiểu rằng các giá trị 2-teta của mẫu nhiễu xạ bột tia X có thể thay đổi một chút giữa máy này với máy kia hoặc giữa mẫu này với mẫu kia, và do đó các giá trị đưa ra không được hiểu là tuyệt đối chính xác.

Đã biết rằng có thể thu được mẫu nhiễu xạ bột tia X có một hoặc nhiều sai số đo tùy thuộc vào điều kiện đo (chẳng hạn như thiết bị hoặc máy móc được sử dụng). Cụ thể là, đã biết rằng cường độ trong mẫu nhiễu xạ bột tia X có thể dao động tùy thuộc vào điều kiện đo. Do đó cần hiểu rằng các dạng rắn theo sáng chế không bị giới hạn ở các tinh thể mà tạo ra mẫu nhiễu xạ bột tia X mà giống với mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên các Hình vẽ, và các tinh thể bất kỳ tạo ra mẫu nhiễu xạ bột tia X về cơ bản giống như được thể hiện trên các Hình vẽ cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhiễu xạ bột tia X có thể đánh giá sự giống nhau thực chất của các mẫu nhiễu xạ bột tia X.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhiễu xạ bột tia X sẽ nhận ra

rằng cường độ tương đối của các đỉnh có thể bị ảnh hưởng bởi, ví dụ như, các hạt có kích thước trên 30 μm và tỷ lệ các mặt không đồng nhất, mà có thể ảnh hưởng đến sự phân tích mẫu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng sẽ nhận ra rằng vị trí phản xạ có thể bị ảnh hưởng bởi chiều cao chính xác mà tại đó mẫu nằm trong nhiễu xạ kế và sự định cỡ ở mức không của nhiễu xạ kế. Tính phẳng bề mặt của mẫu cũng có thể có ảnh hưởng nhỏ. Do đó dữ liệu mẫu nhiễu xạ được thể hiện không được lấy dưới dạng giá trị tuyệt đối. (Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons 1996; Bunn, C.W. (1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, London; Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), X-Ray Diffraction Procedures).

Nhìn chung, sai số đo của góc nhiễu xạ trong biểu đồ nhiễu xạ bột tia X bằng xấp xỉ cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta, và mức độ sai số đo này phải được tính đến khi xem xét mẫu nhiễu xạ bột tia X trên các Hình vẽ và khi đọc dữ liệu chứa trong các Bảng được bao gồm trong bản mô tả này. Ngoài ra, cần hiểu rằng cường độ có thể dao động tùy thuộc vào điều kiện thí nghiệm và sự điều chế mẫu (sự định hướng được ưu tiên).

Trong bản mô tả này dạng của hợp chất N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (sau đây gọi là Hợp chất X) ban đầu được tìm thấy là chất rắn vô định hình. Các dạng đa hình kết tinh hữu dụng của hợp chất đã được sản xuất ra sau đó bằng cách sử dụng các điều kiện được mô tả trong phần thí nghiệm.

Do đó theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X. Dạng đa hình này có thể được xác định đặc điểm trong đó nó tạo ra ít nhất là một trong các giá trị 2θ sau đây đo được bằng cách sử dụng bức xạ CuKa: 15,5, 18,6 và 24,6°.

Dạng đa hình A của Hợp chất X được xác định đặc điểm trong việc tạo ra mẫu nhiễu xạ bột tia X, về cơ bản như được thể hiện trên Hình 1.

Mười đỉnh nhiễu xạ bột tia X đối với dạng đa hình này [Góc 2-teta (2θ), Cường độ (%)] là: 21,1 (100%), 20,8 (54,3%), 14,6 (41,9%), 18,6 (41,6%), 12,3 (38,9%), 15,5 (34,1%), 24,6 (31,3%), 15,8 (30,6%), 13,4 (23,2%) và 19,0°

(21,7%).

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 15,5°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 18,6°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 24,6°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là hai đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 15,5° và 18,6°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 21,1, 20,8, 14,6, 18,6, 12,3, 15,5, 24,6, 15,8, 13,4 và 19,0°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X về cơ bản giống như mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Hình 1.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 15,5° cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 18,6° cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là hai đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 15,5° và 18,6° trong đó các giá trị này có thể là cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình A của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 21,1, 20,8, 14,6, 18,6, 12,3, 15,5, 24,6, 15,8, 13,4 và 19,0° trong đó các giá trị này có thể là cộng hoặc

trừ 0,2° 2-teta.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X. Dạng đa hình này có thể được xác định đặc điểm trong đó nó tạo ra ít nhất là một trong các giá trị 2θ sau đây đo được bằng cách sử dụng bức xạ CuKa: 14,8, 16,2 và 17,9°.

Dạng đa hình E của Hợp chất X được xác định đặc điểm trong việc tạo ra mẫu nhiễu xạ bột tia X, về cơ bản như được thể hiện trên Hình 8.

Mười đỉnh nhiễu xạ bột tia X đối với dạng đa hình này [Góc 2-teta (2θ), Cường độ (%)] là: 17,9 (100%), 14,8 (67,1%), 20,9 (60,1%), 23,1 (55,4%), 16,2 (49,3%), 20,0 (35,6%), 18,2 (32,9%), 12,3 (30,4%), 22,2 (19,0%) và 13,9° (18,9%).

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 17,9°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 14,8°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 17,9°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là hai đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 17,9° và 14,8°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với đỉnh đặc trưng ở khoảng 2-teta = 17,9, 14,8, 20,9, 23,1, 16,2, 20,0, 18,2, 12,3, 22,2 và 13,9°.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X về cơ bản giống như mẫu nhiễu xạ bột tia X được thể hiện trên Hình 8.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 17,9° cộng

hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là một đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 14,8° cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với ít nhất là hai đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 17,9° và 14,8° trong đó các giá trị này có thể là cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Theo bản mô tả này sáng chế đề xuất Dạng đa hình E của Hợp chất X, mà có mẫu nhiễu xạ bột tia X với đỉnh đặc trưng ở 2-teta = 17,9, 14,8, 20,9, 23,1, 16,2, 20,0, 18,2, 12,3, 22,2 và 13,9° trong đó các giá trị này có thể là cộng hoặc trừ 0,2° 2-teta.

Cần hiểu rằng tiền dược chất dược dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) cũng tạo thành một khía cạnh của sáng chế. Theo đó, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng ở dạng tiền dược chất, mà là hợp chất mà bị phá vỡ trong cơ thể người hoặc động vật để giải phóng hợp chất theo sáng chế. Tiền dược chất có thể được sử dụng để làm thay đổi tính chất vật lý và/hoặc tính chất dược động học của hợp chất theo sáng chế. Tiền dược chất có thể được tạo thành khi hợp chất theo sáng chế chứa nhóm hoặc phần tử thế thích hợp mà nhóm làm thay đổi tính chất có thể được gắn vào. Ví dụ về tiền dược chất bao gồm dẫn xuất este hoặc amit có thể phân cắt được in-vivo của hợp chất có công thức (I).

Theo đó, một khía cạnh của sáng chế bao gồm các hợp chất có công thức (I) như xác định ở trên khi được làm cho có sẵn bằng cách tổng hợp hữu cơ và khi được làm cho có sẵn ở trong cơ thể người hoặc động vật bằng cách phân cắt tiền dược chất của chúng. Theo đó, sáng chế bao gồm các hợp chất có công thức (I) mà được sản xuất bằng cách tổng hợp hữu cơ và cũng như là hợp chất mà được sản xuất trong cơ thể người hoặc động vật bằng sự chuyển hóa của hợp chất tiền chất, mà là hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất được sản xuất bằng cách tổng hợp hoặc hợp chất được sản xuất bằng cách chuyển hóa.

Tiền dược chất dược dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) là chất mà dựa trên đánh giá y tế hợp lý là thích hợp để dùng cho cơ thể người hoặc động vật mà không có hoạt tính dược lý không mong muốn và không gây độc quá mức.

Các dạng khác nhau của tiền dược chất đã được mô tả, ví dụ trong các tài liệu sau đây:-

a) Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, edited by K. Widder, *et al.* (Academic Press, 1985);

b) Design of Pro-drugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);

c) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Pro-drugs", by H. Bundgaard p. 113-191 (1991);

d) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);

e) H. Bundgaard, *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988);

f) N. Kakeya, *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 32, 692 (1984);

g) T. Higuchi and V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, Volume 14; và

h) E. Roche (editor), "Bioreversible Carriers in Drug Design", Pergamon Press, 1987.

Hiệu quả *in-vivo* của hợp chất có công thức (I) có thể được gây ra một phần bởi một hoặc nhiều chất chuyển hóa mà được tạo thành ở trong cơ thể người hoặc động vật sau khi dùng hợp chất có công thức (I). Như nêu ở trên, hiệu quả *in-vivo* của hợp chất có công thức (I) cũng có thể được gây ra bởi sự chuyển hóa của hợp chất tiền chất (tiền dược chất).

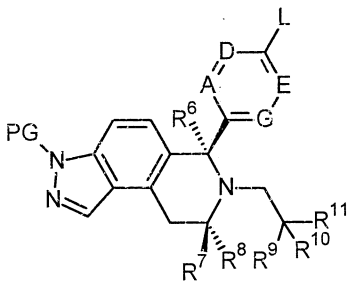
Để tránh sự không rõ ràng cần hiểu rằng trong bản mô tả này khi một nhóm được nêu là "được xác định ở trên" hoặc "được xác định trong bản mô tả này" thì nhóm này bao hàm định nghĩa xuất hiện đầu tiên và rộng nhất cũng như là mỗi và tất cả các định nghĩa thay thế của nhóm đó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng. Quy trình thích hợp được minh họa bằng các biến thể quy trình đại diện sau đây trong đó, trừ khi có chỉ dẫn khác, A, D, E, G, Q và từ R^1 đến R^{12} có nghĩa bất kỳ được xác định ở trên. Các nguyên liệu bắt đầu cần thiết có thể thu được bằng các quy trình tiêu chuẩn của hóa hữu cơ. Việc điều chế các nguyên liệu bắt đầu này được mô tả kết hợp với các biến thể

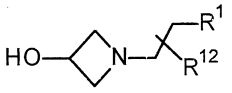
quy trình đại diện sau đây và trong các ví dụ kèm theo. Theo cách khác, các nguyên liệu bắt đầu cần thiết có thể thu được bằng các quy trình tương tự đối với các quy trình được minh họa mà thuộc kỹ năng thông thường của nhà hóa học hữu cơ.

Các hợp chất có công thức (I) trong đó R^{13} là H có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ như:

a) sự ete hóa của hợp chất aryl hoặc heteroaryl thích hợp có công thức (II), trong đó L là ví dụ như halogen (chẳng hạn như iot), hoặc nhóm triflometansulfonyl (triflat), hoặc axit hoặc este boronic, với rượu có công thức (III) bằng cách sử dụng chất xúc tác kim loại thích hợp (ví dụ như Chất tiền xúc tác thế hệ thứ 3 RockPhos) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như toluen hoặc DME) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như xesi cacbonat) và nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 90-120°C); sự loại bỏ của nhóm bảo vệ (PG) trong Công thức (II), chẳng hạn như THP, bằng cách sử dụng điều kiện axit (chẳng hạn như HCl khan trong 1,4-đioxan) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 10-30°C).

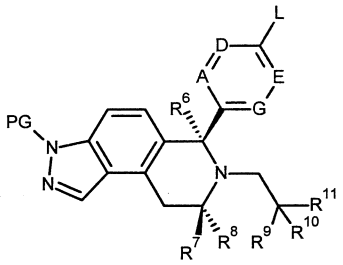


(II)

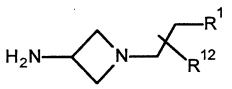


(III)

b) sự amin hóa của hợp chất aryl hoặc heteroaryl thích hợp có công thức (II), trong đó L là ví dụ như halogen chẳng hạn như iot), hoặc nhóm triflometylsulfonyloxy (triflat), với amin có công thức (IV) bằng cách sử dụng chất xúc tác kim loại thích hợp (ví dụ như BrettPhos hoặc RuPhos, và $Pd_2(dba)_3$) trong dung môi thích hợp (ví dụ như 1,4-đioxan) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (ví dụ như xesi cacbonat, natri tert-butoxit, hoặc LiHMDS) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 90-130°C); sự loại bỏ của nhóm bảo vệ (PG), chẳng hạn như THP, bằng cách sử dụng điều kiện axit (chẳng hạn như HCl khan trong 1,4-đioxan) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 10-30°C).

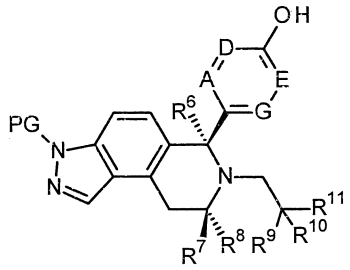


(II)

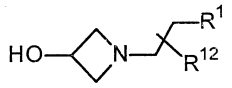


(IV)

c) sự alkyl hóa của hợp chất phenol hoặc hyđroxyl heteroaryl thích hợp có công thức (V) với rượu có công thức (III) thông qua phản ứng Mitsunobu bằng cách sử dụng các chất phản ứng thích hợp (chẳng hạn như triphenylphosphin và điisopropyl (*E*)-điazen-1,2-đicarboxylat) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như THF); sự loại bỏ của nhóm bảo vệ (PG), chẳng hạn như THP, trong Công thức (VII), bằng cách sử dụng điều kiện axit (chẳng hạn như HCl khan trong 1,4-đioxan) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 10-30°C).

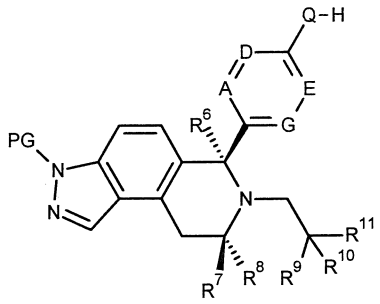


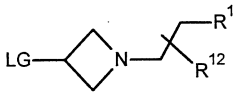
(V)



(III)

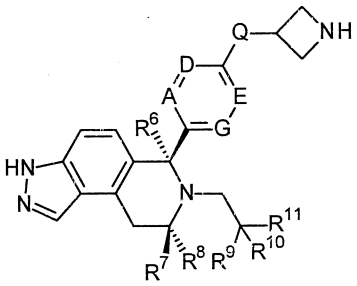
d) sự alkyl hóa của hợp chất anilin hoặc heteroaryl amin hoặc phenol hoặc hyđroxyl heteroaryl thích hợp có công thức (VI) với hợp chất có công thức (VII) trong đó LG là nhóm dời chuyển (chẳng hạn như halogenua hoặc mesylat), bằng cách sử dụng các bazơ êm dịu (ví dụ như DIPEA) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như DMF hoặc MeCN); sự loại bỏ của nhóm bảo vệ (PG), chẳng hạn như THP, bằng cách sử dụng điều kiện axit (chẳng hạn như HCl khan trong 1,4-đioxan) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 10-30°C).

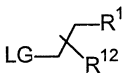




(VI) (VII)

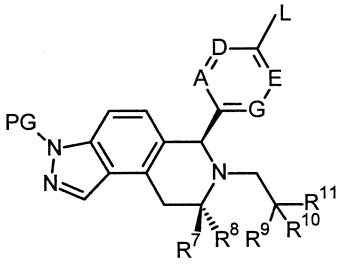
e) sự alkyl hóa của amin có công thức (VIII) với nhóm alkyl hóa thích hợp có công thức (IX) (trong đó LG có thể là halogenua, như bromua, iođua hoặc clorua, hoặc có thể là một số nhóm dời chuyển thích hợp khác, chẳng hạn như mesylat) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như DMF) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như DIPEA) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 10- 30°C).





(VIII) (IX)

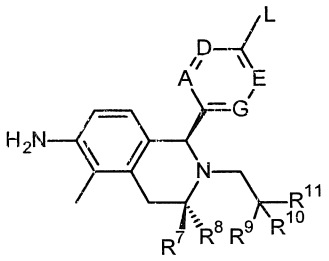
Các hợp chất có công thức (II) trong đó R^6 không phải là hyđro có thể được tạo ra, ví dụ như, từ các hợp chất có công thức (X) bằng cách oxy hóa với chất phản ứng thích hợp (ví dụ như bis(trifloaxetoxy)-iođobenzen) và xử lý bằng chất phản ứng kim loại hữu cơ (ví dụ như metyl magie bromua khi R^6 là metyl) trong dung môi thích hợp (ví dụ như THF) ở nhiệt độ thấp (thường là từ -80 đến -60°C).



(X)

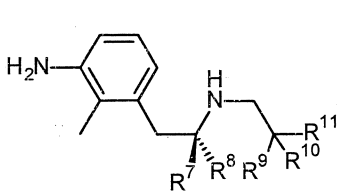
Các hợp chất có công thức (X) có thể được điều chế bằng, ví dụ như, phản

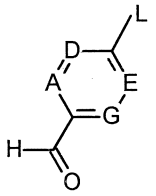
ứng của anilin có công thức (XI) với chất phản ứng thích hợp để thực hiện việc tạo cấu trúc của inđazol chẳng hạn như nitrit vô cơ (chẳng hạn như natri nitrit) trong axit hữu cơ (chẳng hạn như axit propionic) ở nhiệt độ thấp (thường là từ -20 đến 0 °C) hoặc theo cách khác anhyđrit axit (chẳng hạn như axetic anhyđrit) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như kali axetat) cùng với nitrit hữu cơ (chẳng hạn như isopentyl nitrit) tùy ý trong sự có mặt của ete vòng hoa (chẳng hạn như 18-vòng hoa-6) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như cloroform) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 70°C).



(XI)

Các hợp chất có công thức (XI) có thể được tạo ra bằng phản ứng của hợp chất có công thức (XII) với hợp chất có công thức (XIII) trong điều kiện đã biết trong lĩnh vực thích hợp đối với phản ứng Pictet- Spengler, chẳng hạn như trong sự có mặt của axit (chẳng hạn như axit axetic) và trong dung môi thích hợp (ví dụ như toluen hoặc nước) và nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 60 -100°C).

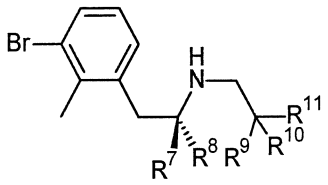




(XII) (XIII)

Các hợp chất có công thức (XII) có thể được điều chế bằng sự chuyển đổi qua lại nhóm chức đã biết trong lĩnh vực, ví dụ như sự amin hóa của halogenua có công thức (XIV) từ aryl halogenua (chẳng hạn như bromua) bằng cách sử dụng amin được bảo vệ (chẳng hạn như điphenylmethanimin) trong sự có mặt của chất xúc tác và phối tử thích hợp (chẳng hạn như bis(đibenzyliđenaxeton)paladi(0) và rac-2,2'- bis(điphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như natri *tert*-butoxit) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như

toluen) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 80- 100°C).



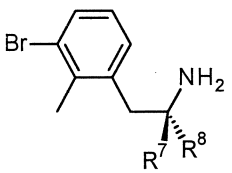
(XIV)

Các hợp chất có công thức (XIV) có thể được điều chế bằng:

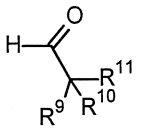
a) phản ứng của hợp chất có công thức (XV) với alđehyt có công thức (XVI), trong dung môi thích hợp (ví dụ như THF) trong sự có mặt của chất khử thích hợp (chẳng hạn như natri triaxetoxyborohyđrit) và ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 20-30°C);

b) (i) phản ứng của hợp chất có công thức (XV) với axit có công thức (XVII) trong điều kiện tạo thành liên kết amit tiêu chuẩn (ví dụ như trong sự có mặt của chất phản ứng ghép nối amit (chẳng hạn như HATU) và bazơ thích hợp (chẳng hạn như trietylamin) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như DMF)), sau đó là (ii) sự khử của liên kết amit thu được bằng cách sử dụng chất khử thích hợp (chẳng hạn như boran) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như THF) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 60-70°C);

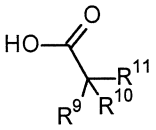
c) phản ứng của hợp chất có công thức (XV) với hợp chất có công thức (XVIII), trong đó LG là nhóm dời chuyển thích hợp (ví dụ như nguyên tử halogen (chẳng hạn như brom hoặc clo) hoặc triflat), trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như điisopropyletylamin) trong dung môi thích hợp (ví dụ như DCM hoặc đioxan) và ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 20-85 °C).



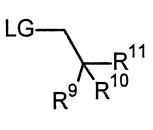
(XV)



(XVI)



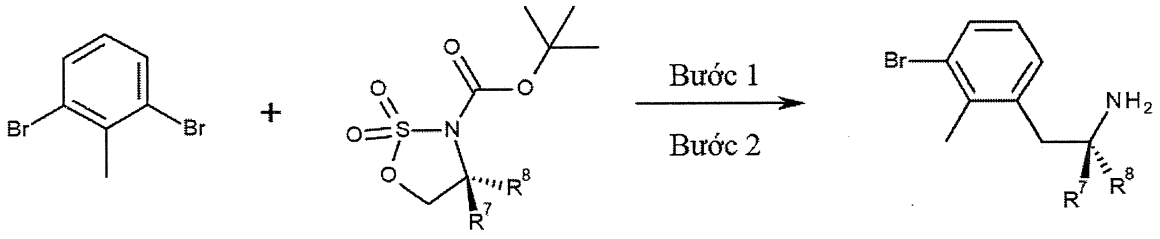
(XVII)



(XVIII)

Các hợp chất có công thức (XV) có thể được điều chế bằng một số phương pháp đã biết trong lĩnh vực để tổng hợp các amin bất đối xứng đáng chú ý là;

a) Sự mở vòng của sulfamiđat có công thức (XIX) theo sơ đồ được thể hiện dưới đây.

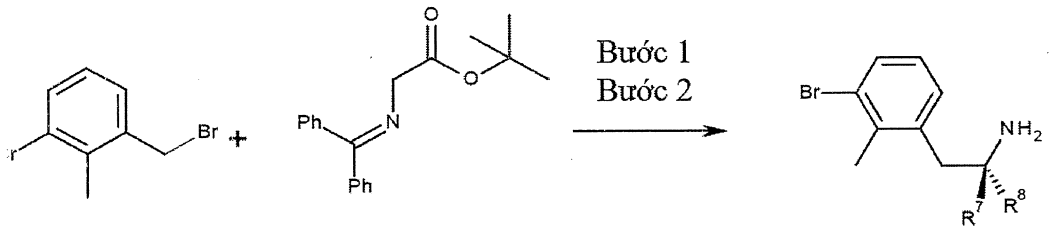


(XIX) (XV)

Bước 1: Sự alkyl hóa, ví dụ như n-butyllithi/THF/từ -78 °C đến 0 °C

Bước 2: Sự loại bỏ nhóm bảo vệ, ví dụ như HCl khan trong MeOH/DCM, nhiệt độ trong phòng.

b) Sự alkyl hóa chuyển pha trong sự có mặt của chất xúc tác bất đối xứng (chẳng hạn như (1*S*,2*S*,4*S*,5*R*)- 2-((*R*)-(allyloxy)(quinolin-4-yl)metyl)-1-(anthraxen-9-ylmetyl)-5-vinylquinucliđin-1-ium bromua) sau đó là thao tác nhóm chức.



Bước 1: Sự alkyl hóa, ví dụ như chất xúc tác bất đối xứng, toluen/KOH, 0 °C

Bước 2: Sự chuyển đổi qua lại nhóm chức.

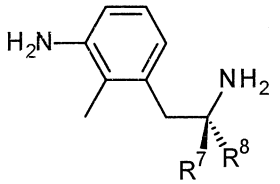
Các hợp chất có công thức (XII) có thể được điều chế trực tiếp bằng:

a) phản ứng của hợp chất có công thức (XX) với alđehyt có công thức (XVI), trong dung môi thích hợp (ví dụ như THF) trong sự có mặt của chất khử thích hợp (chẳng hạn như natri triaxetoxyborohyđrit) và ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 20-30°C);

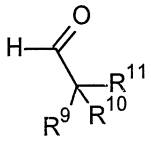
b) (i) phản ứng của hợp chất có công thức (XX) với axit có công thức (XVII) trong điều kiện tạo thành liên kết amit tiêu chuẩn (ví dụ như trong sự có mặt của chất phản ứng ghép nối amit (chẳng hạn như HATU) và bazơ thích hợp (chẳng hạn như trietylamin) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như DMF)), sau đó là (ii) sự khử của liên kết amit thu được bằng cách sử dụng chất khử thích hợp

(chẳng hạn như boran) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như THF) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 60-70°C);

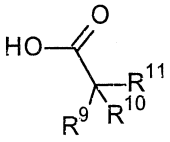
c) phản ứng của hợp chất có công thức (XX) với hợp chất có công thức (XIII), trong đó LG là nhóm dời chuyển thích hợp (ví dụ như nguyên tử halogen (chẳng hạn như brom hoặc clo) hoặc triflat), trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như điisopropyletylamin) trong dung môi thích hợp (ví dụ như DCM hoặc đioxan) và ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 20-85 °C).



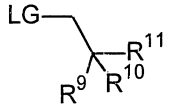
(XX)



(XVI)

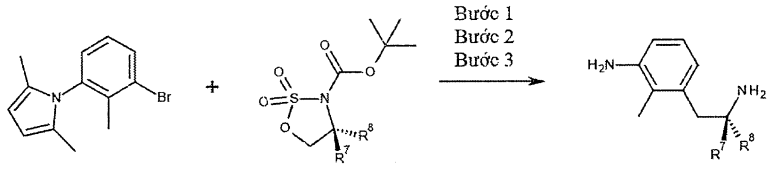


(XVII)



(XVIII)

Các hợp chất có công thức (XX) có thể được điều chế thông qua trình tự phản ứng bắt đầu từ 3-bromo-2-metyl-anilin được bảo vệ như được thể hiện dưới đây.



(XIX) (XX)

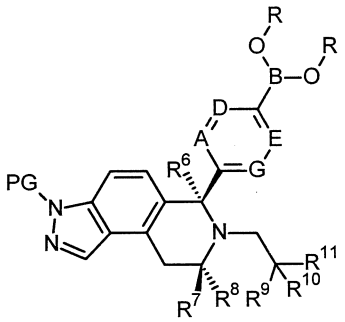
Bước 1: Sự alkyl hóa, ví dụ như n-butyllithi/THF/từ -78 °C đến nhiệt độ môi trường.

Bước 2: Sự loại bỏ nhóm bảo vệ amin, ví dụ như HCl khan trong MeOH/DCM, nhiệt độ trong phòng.

Bước 3: Sự loại bỏ nhóm bảo vệ anilin, ví dụ như hồi lưu trong hyđroxylamin.

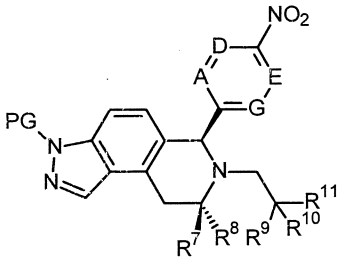
Các hợp chất có công thức (V) có thể được điều chế thông qua trình tự bao gồm sự khép vòng Pictet- Spengler của hợp chất chứa boronat este có công thức (XIII) như được mô tả ở trên để tạo ra hợp chất có công thức (XXI). Hợp chất có công thức (XXI) có thể được oxy hóa thành hợp chất có công thức (V) bằng cách sử dụng chất oxy hóa thích hợp (chẳng hạn như hyđro peroxit) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như natri hyđroxit) trong dung môi thích hợp

(chẳng hạn như THF).



(XXI)

Các hợp chất có công thức (VI, Q là NH) có thể được điều chế thông qua trình tự bao gồm sự khép vòng Pictet-Spengler của hợp chất chứa nitro có công thức (XIII) như được mô tả ở trên để tạo ra hợp chất có công thức (XXII). Hợp chất có công thức (XXII) có thể được khử thành hợp chất có công thức (VI) bằng cách sử dụng điều kiện khử nitro thích hợp (chẳng hạn như sự hyđro hóa) trong sự có mặt của chất xúc tác thích hợp (chẳng hạn như platin đioxit) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như metanol).



(XXII)

Các hợp chất có công thức (VIII), trong đó Q là O, có thể được điều chế từ aryl halogenua có công thức (II) và tert-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat bằng cách sử dụng chất xúc tác kim loại thích hợp (chẳng hạn như Chất tiền xúc tác thế hệ thứ 3 RockPhos) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như toluen hoặc DME) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (chẳng hạn như xesi cacbonat) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 90-120°C); nhóm bảo vệ Boc có thể được loại bỏ sau đó bằng cách sử dụng axit (chẳng hạn như axit trifloaxetic) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như DCM). Các hợp chất có công thức (VIII) (Q là O) cũng có thể được điều chế từ hợp chất có công thức (V) trong điều kiện đã biết trong lĩnh vực thích hợp đối với phản ứng Mitsunobus bằng cách sử dụng các chất phản ứng

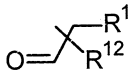
thích hợp (chẳng hạn như triphenylphosphin và điisopropyl (*E*)-điazen-1,2-đicarboxylat) với tert-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như THF).

Các hợp chất có công thức (VIII), trong đó Q là NH, có thể được điều chế từ aryl halogenua có công thức (II) và tert-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat bằng cách sử dụng chất xúc tác kim loại thích hợp (ví dụ như ví dụ như RuPhos hoặc BrettPhos và $Pd_2(dba)_3$) trong dung môi thích hợp (ví dụ như 1,4-đioxan) trong sự có mặt của bazơ thích hợp (ví dụ như xesi cacbonat, natri tert-butoxit, hoặc LiHMDS) ở nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn như 90-130°C); nhóm bảo vệ Boc có thể được loại bỏ sau đó bằng cách sử dụng axit (chẳng hạn như axit trifloaxetic) trong dung môi thích hợp (chẳng hạn như DCM).

Các hợp chất có công thức (III) có thể được điều chế bằng:

a) Phản ứng alkyl hóa giữa 3-hyđroxyazetiđin và các hợp chất có công thức (IX) trong đó LG ví dụ như halogen hoặc nhóm dời chuyển khác (chẳng hạn như nhóm mesyl) trong sự có mặt của bazơ thích hợp, chẳng hạn như xesi cacbonat, trong dung môi thích hợp, chẳng hạn như axetonitril, ở nhiệt độ thích hợp, chẳng hạn như 120 °C, và trong vật chứa thích hợp, chẳng hạn như ống được bịt kín.

b) Phản ứng amin hóa khử giữa các hợp chất 3-hyđroxyazetiđin và alđehyt hoặc keton có công thức (XXIII) trong sự có mặt của chất phản ứng khử thích hợp, chẳng hạn như natri triaxetoxyborohyđrit, trong dung môi thích hợp, chẳng hạn như DCM, ở nhiệt độ thích hợp, chẳng hạn như 10-30 °C.

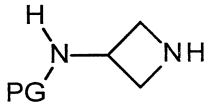


(XXIII)

Các hợp chất có công thức (IV) có thể được điều chế bằng:

a) (i) Phản ứng alkyl hóa giữa hợp chất có công thức (XXIV), trong đó PG là nhóm bảo vệ ví dụ như Boc, và các hợp chất có công thức (IX) trong đó LG là ví dụ như halogen hoặc nhóm dời chuyển khác, chẳng hạn như mesylat, trong sự có mặt của bazơ thích hợp, chẳng hạn như DIPEA, trong dung môi thích hợp, chẳng hạn như 1,4-đioxan, ở nhiệt độ thích hợp, chẳng hạn như 10-30 °C.

(ii) sự loại bỏ của nhóm bảo vệ ở điều kiện thích hợp, chẳng hạn như điều kiện axit để loại bỏ Boc.



(XXIV)

b) (i) Phản ứng amin hóa khử giữa các hợp chất có công thức (XXIV) và các hợp chất alđehyt hoặc keton có công thức (XXIII) trong sự có mặt của chất phản ứng khử thích hợp, chẳng hạn như natri triaxetoxyborohyđrit, trong dung môi thích hợp, chẳng hạn như DCM, ở nhiệt độ thích hợp, chẳng hạn như 10-30 °C. (ii) Sự loại bỏ của nhóm bảo vệ ở điều kiện thích hợp, chẳng hạn như điều kiện axit để loại bỏ Boc .

Cần hiểu rằng các hoán vị khác của các bước quy trình trong biến thể quy trình được mô tả ở trên cũng có thể được.

Cũng rõ ràng rằng trong một số phản ứng nêu ở trên có thể cần hoặc mong muốn bảo vệ nhóm chức nhạy cảm bất kỳ trong hợp chất. Các trường hợp mà sự bảo vệ là cần thiết hoặc mong muốn, và phương pháp bảo vệ thích hợp, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Nhóm bảo vệ thông thường có thể được sử dụng theo thực hành tiêu chuẩn (xem minh họa trong T. W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, 1991). Do đó, nếu các chất phản ứng bao gồm nhóm chẳng hạn như amino, cacboxy hoặc hyđroxy, thì có thể mong muốn bảo vệ nhóm này trong một số phản ứng nêu trong bản mô tả này.

Nhóm bảo vệ thích hợp đối với nhóm amino hoặc alkylamino là, ví dụ, nhóm axyl, ví dụ nhóm alkanoyl chẳng hạn như axetyl, nhóm alkoxycacbonyl, ví dụ nhóm metoxycacbonyl, etoxycacbonyl hoặc *t*-butoxycacbonyl, nhóm arylmetoxycacbonyl, ví dụ benzyloxycacbonyl, hoặc nhóm aroyl, ví dụ benzoyl. Điều kiện khử bảo vệ đối với nhóm bảo vệ nêu trên cần thay đổi theo sự lựa chọn nhóm bảo vệ. Do đó, ví dụ, nhóm axyl chẳng hạn như nhóm alkanoyl hoặc nhóm alkoxycacbonyl hoặc nhóm aroyl có thể được loại bỏ ví dụ, bằng cách thủy phân với bazơ thích hợp chẳng hạn như kim loại kiềm hyđroxit, ví dụ lithi hoặc natri

hyđroxit. Theo cách khác nhóm alkoxycarbonyl chẳng hạn như nhóm *t*-butoxycarbonyl có thể được loại bỏ, ví dụ như, bằng cách xử lý bằng axit thích hợp như axit clohyđric, axit sulphuric, axit formic, axit phosphoric hoặc axit trifloaxetic, và nhóm arylmetoxycarbonyl chẳng hạn như nhóm benzyloxycarbonyl có thể được loại bỏ, ví dụ như, bằng cách hyđro hóa trên chất xúc tác chẳng hạn như palađi-trên-cacbon, hoặc bằng cách xử lý bằng axit Lewis, chẳng hạn như bo tris(trifloaxetat). Nhóm bảo vệ thay thế thích hợp đối với nhóm amino bậc một là, ví dụ, nhóm phthaloyl mà có thể được loại bỏ bằng cách xử lý bằng alkylamin, ví dụ đimetylaminopropylamin, hoặc hyđrazin.

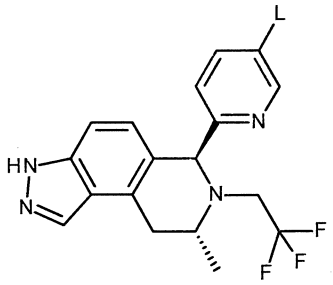
Nhóm bảo vệ thích hợp đối với nhóm hyđroxy là, ví dụ, nhóm axyl, ví dụ nhóm alkanoyl chẳng hạn như axetyl, nhóm aroyl, ví dụ benzoyl, nhóm arylmetyl, ví dụ benzyl, hoặc trialkyl hoặc điarylalkyl silan, chẳng hạn như TBDMS hoặc TBDPS. Điều kiện khử bảo vệ đối với nhóm bảo vệ nêu trên cần thay đổi theo sự lựa chọn nhóm bảo vệ. Do đó, ví dụ, nhóm axyl chẳng hạn như nhóm alkanoyl hoặc aroyl có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách thủy phân với bazơ thích hợp chẳng hạn như kim loại kiềm hyđroxit, ví dụ lithi hoặc natri hyđroxit. Theo cách khác nhóm arylmetyl chẳng hạn như nhóm benzyl có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách hyđro hóa qua chất xúc tác chẳng hạn như palađi-trên-cacbon.

Nhóm bảo vệ thích hợp đối với nhóm cacboxy là, ví dụ, nhóm este hóa, ví dụ nhóm metyl hoặc etyl mà có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách thủy phân bằng bazơ chẳng hạn như natri hyđroxit, hoặc ví dụ nhóm *t*-butyl mà có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách xử lý bằng axit, chẳng hạn như axit trifloaxetic, hoặc ví dụ nhóm benzyl mà có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách hyđro hóa qua chất xúc tác chẳng hạn như palađi-trên-cacbon.

Nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ ở giai đoạn thuận tiện bất kỳ trong quá trình tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực hóa học.

Các hợp chất trung gian nhất định được xác định trong bản mô tả này là mới và chúng được nêu dưới dạng các dấu hiệu khác của sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (XXV), hoặc muối của chúng:



(XXV)

trong đó L là brom, clo, iot hoặc triflometansulfonyl.

Theo phương án khác, L là brom.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thử nghiệm sinh học

Các thử nghiệm sau đây được sử dụng để đánh giá hiệu quả của các hợp chất theo sáng chế.

Thử nghiệm liên kết ERα

Khả năng của các hợp chất để liên kết với miền liên kết Phối Tử Thụ Thể Estrogen Alpha được phân lập (ER alpha – LBD (GST)) được đánh giá trong các thử nghiệm cạnh tranh bằng cách sử dụng điểm kết thúc phát hiện chuyển giao năng lượng cộng hưởng huỳnh quang phân giải thời gian (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer - TR-FRET) LanthaScreen™. Đối với điểm kết thúc TR-FRET LanthaScreen, chất phát huỳnh quang thích hợp (Fluormone ES2, ThermoFisher, Mã sản phẩm P2645) và miền liên kết phối tử thụ thể estrogen alpha ở người tái tổ hợp, các gốc 307-554 (được biểu hiện và được tinh chế nội bộ) được sử dụng để đo sự liên kết hợp chất. Nguyên tắc thử nghiệm là ER alpha -LBD (GST) được bổ sung vào phối tử phát huỳnh quang để tạo thành phức hợp thụ thể/chất phát huỳnh quang. Kháng thể kháng-GST được gắn nhãn tecbi (Mã sản phẩm PV3551) được sử dụng để gắn nhãn gián tiếp thụ thể bằng cách liên kết với đuôi GST của nó, và sự liên kết cạnh tranh được phát hiện bằng khả năng của hợp chất thử nghiệm để thay thế phối tử phát huỳnh quang, dẫn đến sự mất tín hiệu TR-FRET giữa kháng thể Tb-kháng-GST và chất đánh dấu. Thử nghiệm được thực hiện như sau với tất cả các lần bổ sung chất phản ứng được thực hiện bằng cách sử dụng trạm làm việc vi lưu Beckman

Coulter BioRAPTR FRD:

1. Phân tán bằng âm thanh 120 nl của hợp chất thử nghiệm vào đĩa thử nghiệm 384 giếng thể tích thấp màu đen.
2. Điều chế 1x ER alpha -LBD/Tb-kháng GST Ab trong chất đệm sàng lọc ES2 và ủ trong thời gian 15 phút.
3. Phân tán 6 µl chất phản ứng 1x AR-LBD/Tb-kháng-GST Ab vào mỗi giếng của đĩa thử nghiệm sau đó là 6 µl chất phản ứng phát huỳnh quang vào mỗi giếng của đĩa thử nghiệm
4. Phủ đĩa thử nghiệm để bảo vệ chất phản ứng khỏi ánh sáng và sự bay hơi, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ.
5. Kích thích ở 337 nm và đo tín hiệu phát huỳnh quang của mỗi giếng ở 490 nm và 520 nm bằng cách sử dụng BMG PheraSTAR.

Các hợp chất được định liều trực tiếp từ vi đĩa nguồn hợp chất chứa hợp chất được pha loãng theo dãy (4 giếng lần lượt chứa 10 mM, 0,1 mM, 1 mM và 10 nM hợp chất cuối cùng) vào vi đĩa thử nghiệm bằng cách sử dụng Labcyte Echo 550. Echo 550 là bộ xử lý dịch lỏng mà sử dụng công nghệ âm thanh để thực hiện việc chuyển trực tiếp từ vi đĩa này sang vi đĩa khác của dung dịch hợp chất DMSO và hệ thống có thể được lập trình để chuyển nhiều thể tích nl nhỏ của hợp chất từ các giếng đĩa nguồn khác nhau để tạo ra sự pha loãng theo dãy mong muốn của hợp chất trong thử nghiệm mà sau đó được làm đầy trở lại để chuẩn hóa nồng độ DMSO trong khoảng giá trị độ pha loãng.

Trong tổng số 120 nl của hợp chất cộng với DMSO được bổ sung vào mỗi giếng và các hợp chất wđược thử nghiệm ở định dạng đáp ứng nồng độ 12 điểm trong khoảng giá trị nồng độ hợp chất cuối cùng lần lượt là 10, 2,917, 1,042, 0,2083, 0,1, 0,0292, 0,0104, 0,002083, 0,001, 0,0002917, 0,0001042, và 0,00001 µM. Dữ liệu đáp ứng liều lượng TR-FRET thu được với mỗi hợp chất được xuất vào gói phần mềm thích hợp (chẳng hạn như Origin hoặc Genedata) để thực hiện phân tích làm khớp đường cong. Sự liên kết ER alpha cạnh tranh được biểu diễn dưới dạng giá trị IC_{50}. Nó được xác định bằng cách tính nồng độ của hợp chất cần để tạo ra sự giảm 50% của hợp chất đánh dấu liên kết với ER alpha-LBD.

<u>Thử nghiệm điều hòa giảm MCF-7 ER</u>

Khả năng của một số hợp chất để điều hòa giảm thụ thể estrogen (ER) được đánh giá trong thử nghiệm miễn dịch-huỳnh quang trên cơ sở tế bào bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư biểu mô ống vú ở người MCF-7. Các tế bào MCF-7 được làm sống lại trực tiếp từ ống cryovial (xấp xỉ 5×10^6 tế bào) trong Môi trường thử nghiệm (môi trường Eagle cải biến Dulbecco (DMEM) không chứa đỏ phenol; Sigma D5921) chứa 2mM L-Glutamin và 5% (thể tích/thể tích) huyết thanh thai bò được xử lý Than hoạt tính/Đextran. Tế bào được hút vào bơm tiêm một lần bằng cách sử dụng kim khổ lớn 18G x 1,5 insơ (1,2 × 40 mm) tiệt trùng và mật độ tế bào được đo bằng cách sử dụng Thiết bị đếm Coulter (Beckman). Tế bào được pha loãng thêm trong Môi trường thử nghiệm đến mật độ $3,75 \times 10^4$ tế bào trong mỗi ml và 40 µl mỗi giếng được bổ sung vào đĩa 384 giếng được xử lý bằng môi trường nuôi cấy mô, màu đen, đáy trong suốt (Costar, Số 3712) bằng cách sử dụng Thermo Scientific Matrix WellMate hoặc Thermo Multidrop. Sau khi cấy tế bào, ủ đĩa qua đêm ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% (thiết bị ủ Liconic carousel). Tạo ra dữ liệu thử nghiệm bằng cách sử dụng thiết bị tái định dạng hợp chất LabCyte Echo™ kiểu 555 mà là một phần của ngăn làm việc tự động (ngăn làm việc Echo 2 tích hợp). Dung dịch dự trữ hợp chất (10 mM) của các hợp chất thử nghiệm được sử dụng để tạo ra đĩa định liều hợp chất 384 giếng (Labcyte P-05525-CV1). 40 µl của mỗi dung dịch dự trữ hợp chất 10 mM được phân tán vào giếng phần tư thứ nhất và sau đó sự pha loãng theo dãy từng bậc 1:100 trong DMSO được thực hiện bằng cách sử dụng đơn vị xử lý dịch lỏng Hydra II (MATRIX UK) để tạo ra 40 µl hợp chất đã pha loãng lần lượt vào các giếng phần tư 2 (0,1 mM), 3 (1 µM) và 4 (0,01 µM). 40 µl DMSO được bổ sung vào giếng ở hàng P trên đĩa nguồn để cho phép chuẩn hóa DMSO trong khoảng giá trị liều lượng. Để định lượng các giếng đối chứng 40 µl DMSO được bổ sung vào hàng O1 và 40 µl 100 µM fulvestrant trong DMSO được bổ sung vào hàng O3 trên đĩa nguồn hợp chất.

Echo sử dụng công nghệ âm thanh để thực hiện việc chuyển trực tiếp từ vi đĩa này sang vi đĩa khác của dung dịch hợp chất DMSO vào các đĩa thử nghiệm. Hệ thống có thể được lập trình để chuyển các thể tích thấp bằng 2,5 nl trong nhiều gia lượng giữa các vi đĩa và khi làm như vậy tạo ra sự pha loãng theo dãy của hợp

chất trong đĩa thử nghiệm mà sau đó được làm đầy trở lại để chuẩn hóa nồng độ DMSO trong khoảng giá trị độ pha loãng. Các hợp chất được phân tán lên đĩa tế bào với đĩa nguồn hợp chất đã được chuẩn bị như trên tạo ra khoảng giá trị liều lượng từ 3 µM đến 3 pM hai bản sao 12 điểm với các độ pha loãng 3 lần và một độ pha loãng 10 lần cuối cùng bằng cách sử dụng ngăn làm việc Echo 2 tích hợp. Giếng đối chứng tín hiệu lớn nhất được định liều với DMSO để tạo ra nồng độ cuối cùng bằng 0,3%, và giếng đối chứng tín hiệu nhỏ nhất được định liều với fulvestrant để tạo ra nồng độ cuối cùng bằng 100 nM theo đó. Các đĩa được ủ thêm trong thời gian 18-22 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% và sau đó được cố định bằng cách bổ sung 20 µl dung dịch formalđehyt 11,1% (thể tích/thể tích) (trong nước muối đệm photphat (PBS)) tạo ra nồng độ formalđehyt cuối cùng bằng 3,7% (thể tích/thể tích). Tế bào được cố định ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút trước khi được rửa hai lần bằng 250 µl PBS/Proclin (PBS với chất bảo quản Biocide) bằng cách sử dụng máy rửa đĩa BioTek, sau đó 40 µl PBS/Proclin được bổ sung vào tất cả các giếng và các đĩa được lưu trữ ở nhiệt độ 4 °C. Phương pháp cố định được mô tả ở trên được thực hiện trên ngăn làm việc Echo 2 tích hợp. Việc nhuộm màu miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng ngăn làm việc AutoElisa tự động. PBS/Proclin được hút từ tất cả các giếng và tế bào được thấm hóa bằng 40 µl PBS chứa Tween™ 20 0,5% (thể tích/thể tích) trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa ba lần trong 250 µl PBS/0,05% (thể tích/thể tích) Tween 20 với Proclin (PBST với chất bảo quản Biocide) và sau đó 20 µl kháng thể đơn dòng Thỏ ERα (SP1) (Thermofisher) 1:1000 trong PBS/Tween™/Albumin Huyết Thanh Bò 3% (khối lượng/thể tích) được bổ sung. Ủ đĩa qua đêm ở nhiệt độ 4 °C (thiết bị ủ Liconic carousel) và sau đó rửa ba lần trong 250 µl PBS/Tween™ 20 0,05% (thể tích/thể tích) với Proclin (PBST). Sau đó ủ các đĩa với 20 µl/giếng của IgG AlexaFluor 594 kháng-thỏ ở dê hoặc kháng thể AlexaFluor 488 kháng-thỏ ở dê (Molecular Probes) với Hoechst ở 1:5000 trong PBS/Tween™/Albumin Huyết Thanh Bò 3% (khối lượng/thể tích) trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó rửa các đĩa ba lần trong 250 µl PBS/Tween™ 20 0,05% (thể tích/thể tích) với Proclin (PBST với chất bảo quản Biocide). Bổ sung 20 µl PBS vào mỗi giếng và phủ các đĩa bằng tấm bịt đĩa màu

đen và lưu trữ ở nhiệt độ 4°C trước khi đọc. Đọc đĩa bằng cách sử dụng Cellomics Arrayscan đọc độ huỳnh quang 594 nm (thời điểm 24 giờ) hoặc 488 nm (thời điểm 5 giờ) để đo hàm lượng thụ thể ERα trong mỗi giếng. Chuẩn hóa tổng cường độ trung bình đối với số lượng tế bào tạo ra tổng cường độ ở mỗi tế bào. Dữ liệu được xuất vào gói phần mềm thích hợp (chẳng hạn như Origin) để thực hiện phân tích làm khớp đường cong. Sự điều hòa giảm của thụ thể ERα được biểu diễn dưới dạng giá trị IC_{50} và được xác định bằng cách tính nồng độ của hợp chất cần để tạo ra sự giảm 50% của tín hiệu Tổng Cường Độ lớn nhất trung bình.

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng A được tạo ra (dữ liệu dưới đây có thể là kết quả từ thí nghiệm đơn lẻ hoặc giá trị trung bình của hai hoặc hơn hai thí nghiệm):

Bảng A

Ví dụ	Giá trị IC50 của sự liên kết ER (nM)	Giá trị IC50 của sự điều hòa giảm ER (nM)[1]
1	3,7	0,10
2	2,8	3,1
3	6,5	0,64
4	6,9	0,34
5	2,2	0,077
6	8,8	0,35
7	8,4	0,4
8	2,0	0,055
9	360	>300
10	8	0,26
11	20	0,094
12	2,4	0,25 (83%)
13	3,5	0,11
14	6,6	>300
15	9,5	0,33 (84%)
16	6,9	0,54
17	2,4	0,16
18	29	0,42
19	2,6	0,063
20	15	0,36
21	2,1	0,098
22	5,7	0,062
23	15	0,15
24	10	0,21
25	4,1	0,33

26	6,7	0,52
27	0,81	0,05
28	5,7	0,065
29	1,6	0,2
30	1,8	0,28
31	13	0,54
32	2,1	0,096
33	1,4	0,1
34	1,9	0,22
35	1,5	0,17
36	1,8	0,12
37	7,2	4,1
38	0,69	0,19
39	0,94	0,048
40	1,3	0,1
41	2,4	0,17
42	3,8	0,28
43	4,1	0,25
44	9,6	0,91
45	1,6	0,3
46	3,6	0,4
47	1,2	0,41
48	1,5	0,078
49	1,5	0,075
50	2,7	0,47
51	2,8	0,68
52	11	0,21
53	5,7	0,26
54	160	>300
55	8,2	1,1
56	8,2	0,58
57	5	0,36
58	2,1	0,56
59	7,2	1,6
60	4,7	0,19
61	0,88	0,13
62	1	0,13
63	73	0,31
64	6,1	0,22
65	5,3	1
66	6,2	0,44
67	5	0,27
68	15	0,4
69	8,9	0,55
70	4,3	0,31

71	2	0,17
72	2,9	0,51
73	3,4	0,77

[1]Các hợp chất mà có hoạt tính trong thử nghiệm điều hòa giảm ER thể hiện các giá trị điều hòa giảm >90% trong thử nghiệm trừ khi có chỉ dẫn khác, trong trường hợp đó % điều hòa giảm được thể hiện trong dấu ngoặc đơn.

Thử nghiệm thẩm tách Western

Khả năng của các hợp chất để điều hòa giảm thụ thể estrogen (ER) được đánh giá bằng thẩm tách western bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư vú ở người (MCF-7 và CAMA-1). Láng tế bào vào đĩa đã được xử lý bằng môi trường nuôi cấy mô 12 giếng ở $0,5x10^6$/giếng trong RPMI không chứa đỏ phenol chứa 2mM L-glutamin và huyết thanh thai bò đã xử lý than hoạt tính 5% (thể tích/thể tích) (F6765, Sigma). Ủ tế bào với các hợp chất (100 nM) hoặc đối chứng tá dược lỏng (DMSO 0,1%) trong thời gian 48 giờ ở nhiệt độ 37 °C, CO_2 5% trước khi rửa một lần bằng PBS và dung giải bằng 80 µl chất đệm dung giải (25 mM Tris/HCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 50 mM NaF, 2 mM natri orthovanađat, 0,27 M sucroza, 10mM β-glyxerophotphat, 5 mM natri pyrophotphat 0,5% TritonX-100, độ pH 6,8) trên nước đá.

Tế bào được cạo, nghiền bằng siêu âm và ly tâm trước khi thực hiện thử nghiệm protein (bộ kit Protein DC Bio-Rad, 500-0116) và tạo ra các mẫu đến nồng độ protein bằng 1-2mg/ml trong chất đệm dung giải chứa 1xLDS chất đệm mẫu (NP0007, Invitrogen) và 1x NuPAGE chất khử mẫu (NP0009, Invitrogen). Các mẫu được đun sôi trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 95 °C và sau đó kết đông ở nhiệt độ -20 °C đến khi sẵn sàng để sử dụng.

10-20 µg protein được tải lên gel Criterion 26 giếng (BioRad 345-0034). Gel được chạy ở 125 V trong thời gian 1 giờ 25 phút trong chất đệm chạy (24 mM Bazơ Tris Sigma, 192 mM Glyxin, 3,5 mM SDS, tạo thành trong nước chưng cất). Sau đó chuyển gel ở 30V trong thời gian 2 giờ trong chất đệm chuyển (25 mM Tris, 192 mM Glyxin, 20% (thể tích/thể tích) metanol, độ pH 8,3, tạo thành trong nước chưng cất) lên màng nitroxenluloza. Nhuộm màu màng thẩm tách bằng Ponceau S (P7170, Sigma) và cắt theo chất chỉ thị khối lượng phân tử thích hợp.

Phong bế màng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong Marvel

5% (khối lượng/thể tích) trong nước muối đệm photphat chứa Tween™ 20 0,05% (PBS/Tween). Sau đó ủ màng thẩm tách với kháng thể đơn dòng thỏ kháng-ERα (SP1) (Thermofisher) được pha loãng 1:1000 ở nhiệt độ 4 °C qua đêm (có lắc nhẹ) sau đó là một vài lần rửa bằng PBS/Tween. Kháng thể HRP kháng-thỏ thứ cấp (7074, CST) được pha loãng ở độ pha loãng 1:2000 được ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (có lắc nhẹ) sau đó là một vài lần rửa bằng PBS/Tween. Tất cả các kháng thể được tạo thành trong Marvel 5% (khối lượng/thể tích) trong PBS/Tween.

Thẩm tách miễn dịch được phát triển bằng cách sử dụng chất phản ứng phát quang hóa học Pierce WestDura (Thermo Scientific 34076) và phát triển / định lượng trên G-box bằng cách sử dụng phần mềm Syngene. Sự điều hòa giảm của thụ thể ERα được chuẩn hóa đến đối chứng tá dược lỏng (sự điều hòa giảm 0%) và đối chứng fulvestrant 100 nM (sự điều hòa giảm 100%) chạy trong cùng gel.

Bảng B thể hiện dữ liệu được tạo ra đối với các ví dụ được chọn (dữ liệu dưới đây có thể là kết quả từ thí nghiệm đơn lẻ hoặc giá trị trung bình của hai hoặc hơn hai thí nghiệm):

Bảng B

Ví dụ	CAMA1 Western %ER deg so với Fv	MCF7 Western %ER deg so với Fv
1	92	91
2	95	93
3	102	90
4	61	70
5	109	99
6	84	89
7	90	90
8	100	101
9	25	-13
16	105	104
17	96	92
18	95	103
19	94	92
21	101	99
25	96	98
26	97	97

27	108	110
28	110	95
29	106	93
30	98	96
31	95	103
32	89	89
33	102	98
34	82	85
40	120	98
42	79	92
46	102	105
48	94	93
49	99	98
53	46	81
56	52	61
59	102	104
64	89	86
69	98	95
70	100	102

Thử nghiệm tế bào gan người

Độ ổn định chuyển hóa của các hợp chất ở tế bào gan người được đánh giá bằng cách sử dụng quy trình sau đây:

1. Điều chế dung dịch dự trữ 10 mM của hợp chất và hợp chất đối chứng trong dung môi thích hợp (DMSO). Đặt môi trường ủ (L-15Medium) trong bể nước 37°C, và để cho ấm lên trong ít nhất là 15 phút trước khi sử dụng.
2. Bổ sung 80 µl axetonitril vào mỗi giếng của đĩa giếng sâu 96 giếng (đĩa dập tắt).
3. Trong đĩa 96 giếng mới, pha loãng hợp chất thử nghiệm 10 mM và hợp chất đối chứng đến 100 µM bằng cách kết hợp 198 µl axetonitril và 2 µl dung dịch dự trữ 10 mM.
4. Lấy lọ chứa tế bào gan người được bảo quản đông lạnh cryo (nhỏ hơn -150 °C) (tế bào gan Người Cho LiverPool™ 10 thu được từ Celsis IVT. Chicago, IL (Sản phẩm Số S01205)) từ kho lưu trữ, đảm bảo rằng các lọ vẫn ở nhiệt độ đông lạnh cryo đến khi quy trình rã đông xảy ra. Càng nhanh càng tốt, rã đông tế bào bằng cách đặt lọ trong bể nước 37°C và

lắc nhẹ lọ. Các lọ cần phải vẫn ở trong bể nước đến khi tất cả tinh thể nước đá hòa tan và không còn nhìn thấy được nữa. Sau khi hoàn thành việc rã đông, phun lọ bằng etanol 70%, chuyển lọ vào tủ an toàn sinh học.

5. Mở lọ và rót chất chứa bên trong vào ống hình nón 50 ml chứa môi trường rã đông. Đặt ống hình nón 50 ml vào máy ly tâm và quay ở tốc độ 100 g trong thời gian 10 phút. Khi hoàn thành việc quay, hút môi trường rã đông ra và tái tạo huyền phù tế bào gan trong môi trường ủ đủ để tạo ra ~$1,5\times10^6$ tế bào/ml.
6. Bằng cách sử dụng Cellometer® Vision, đếm tế bào và xác định mật độ tế bào sống. Tế bào có khả năng sống kém (khả năng sống <80%) không được chấp nhận để sử dụng. Pha loãng tế bào bằng môi trường ủ đến mật độ tế bào làm việc bằng $1,0\times10^6$ tế bào sống/ml.
7. Chuyển 247,5 µl tế bào gan vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng. Đặt đĩa lên thiết bị lắc đĩa Eppendorf Thermomixer Comfort để cho phép tế bào gan ấm lên trong thời gian 10 phút.
8. Bổ sung 2,5 µl hợp chất thử nghiệm hoặc hợp chất đối chứng 100 µM vào giếng ủ chứa tế bào, trộn để đạt được huyền phù đồng nhất ở 0,5 phút, mà khi đạt được, sẽ xác định thời điểm 0,5 phút. Vào thời gian 0,5 phút, chuyển 20 µl hỗn hợp đã được ủ vào giếng trong "đĩa dập tắt" sau đó là trộn.
9. Ủ đĩa ở nhiệt độ 37°C ở tốc độ 900 vòng/phút trên thiết bị lắc đĩa Eppendorf Thermomixer Comfort. Vào 5, 15, 30, 45, 60, 80, 100 và 120 phút, trộn hệ thống ủ và chuyển các mẫu của 20 µl hỗn hợp đã được ủ ở mỗi thời điểm vào các giếng trong "đĩa dập tắt" riêng rẽ sau đó trộn.
10. Ly tâm đĩa dập tắt trong thời gian 20 phút ở tốc độ 4.000 vòng/phút. 4 hợp chất khác nhau được gom vào một cát xét và được sử dụng cho phân tích LC/MS/MS.

Tất cả các phép tính được thực hiện bằng cách sử dụng Microsoft Excel. Diện tích đỉnh được xác định từ sắc ký đồ ion chiết xuất. *Độ thanh thải nội tại in vitro* (Cl_{int} in vitro, theo l/phút/10^6 tế bào) của hợp chất mẹ được xác định bằng

cách phân tích hồi quy đường cong sự biến mất của mẹ theo phần trăm Ln theo thời gian. Độ thanh thải nội tại *in vitro* (Cl_{int} in vitro, theo l/phút/10^6 tế bào) được xác định từ giá trị hệ số góc bằng cách sử dụng công thức sau đây và được thể hiện trong Bảng C đối với các ví dụ được chọn:

Cl_{int} in vitro =kV/N

V = thể tích ủ (0,25 ml);

N = số lượng tế bào gan mỗi giếng (0,25 × 10^6 tế bào).

Bảng C

Ví dụ	Cl_{int} (µl/phút/10^6 tế bào)
1	11
2	6
3	5
6	2
11	7
17	6
18	3
19	5
21	6
25	5
28	5
48	4

Tính chất vật lý

logD

Độ ưa lipit của thuốc là tính chất vật lý quan trọng mà có thể ảnh hưởng đến nhiều tính chất sinh học và chuyển hóa của hợp chất, ví dụ như độ hấp thụ, sự phân tán, sự chuyển hóa, sự bài tiết và biên dạng gây độc của hợp chất. Hệ số phân tán giữa 1-octanol và chất đệm trong nước, LogDO/W, ở độ pH 7,4, là là phép đo thường được sử dụng nhất của độ ưa lipit của hợp chất. Phương pháp hiện nay để đo LogDO/W dựa trên kỹ thuật bình lắc truyền thống, nhưng có cải biến để đo các hợp chất trong hỗn hợp của mười hợp chất một lần bằng cách sử dụng UPLC với phép đo phổ khối định lượng (MS) làm phương pháp để đo các nồng độ octanol và trong nước tương đối. Dung tích lớn nhất là 379 hợp chất dự kiến (48 tập hợp với 10 hợp chất bao gồm ba hợp chất QC) trong mỗi thí nghiệm.

2 mẫu đối chứng định lượng (QC), xyclobenzaprin với LogD vừa phải và Nicardipin LogD cao được sử dụng trong tất cả các tập hợp để đảm bảo chất lượng tốt. Mẫu QC khác Cafein, với LogD thấp, được sử dụng và được cho ngẫu nhiên vào tất cả các lần chạy. Phương pháp này đã được xác nhận kỹ so với các phương pháp bình lắc trước đây.

Độ hòa tan

Để cho hợp chất dùng qua đường miệng đến được vị trí tác động, và để cho sự hấp thụ qua đường miệng từ ruột diễn ra, hợp chất phải ở trong dung dịch, và do đó các hợp chất mà có độ hòa tan bên trong cao có thể thích hợp hơn để dùng cho dược phẩm. Độ hòa tan nhiệt động học của hợp chất nghiên cứu được đo được trong điều kiện tiêu chuẩn. Nó là phương pháp bình lắc mà sử dụng dung dịch DMSO 10 mM mà được cung cấp từ kho dự trữ dịch lỏng Compound Managements và là phương pháp thông lượng cao. Các hợp chất khô được làm cân bằng trong chất đệm photphat trong nước (độ pH 7,4) trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 25°C, sau đó phần có hợp chất hòa tan được tách ra khỏi phần còn lại. Dung dịch được phân tích và định lượng bằng cách sử dụng UPLC/MS/MS, các mẫu QC được kết hợp trong mỗi lần chạy thử nghiệm để đảm bảo chất lượng của thử nghiệm.

Liên kết protein huyết tương người

Liên kết protein huyết tương người là yếu tố then chốt trong việc kiểm soát hàm lượng của thuốc tự do (không liên kết) có sẵn để liên kết với đích và do đó đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả quan sát được của thuốc in vivo. Do đó, các hợp chất mà có phân đoạn tự do cao (hàm lượng thấp của liên kết protein huyết tương) có thể thể hiện hiệu quả được tăng cường so với hợp chất có hiệu lực và mức độ bộc lộ tương tự. Thử nghiệm thẩm tách cân bằng tự động ở huyết tương người sử dụng Thiết bị RED (Rapid Equilibrium Dialysis - Thẩm Tách Cân Bằng Nhanh) và lấy mẫu. Thử nghiệm thường chạy trong từ hai đến ba ngày bao gồm sự phân phối kết quả. Sau khi thẩm tách trong thời gian 18 giờ, các mẫu huyết tương và chất đệm được điều chế để phân tích bằng sắc ký lỏng và phép đo phổ khối. Các mẫu thường được thử nghiệm trong một bản sao và được định lượng bằng LC/MSMS bằng cách sử dụng đường cong định cỡ 7 điểm trong huyết

tương. Các hợp chất được gom với nhau trong tập hợp huyết tương lên đến 10 hợp chất. Ba hợp chất tham chiếu được sử dụng trong mỗi lần chạy, Propranolol, Metoprolol và Warfarin. Warfarin được sử dụng làm đối chứng trong mỗi tập hợp và Propranolol và Metoprolol được đặt ngẫu nhiên trong mỗi lần chạy. Excel macro nội bộ được sử dụng để tạo tệp cho robot và khối phổ kế và cũng được sử dụng để tính phân đoạn không liên kết (fu%) trong huyết tương.

Bảng D thể hiện dữ liệu đối với logD, độ hòa tan và liên kết protein huyết tương được tạo ra đối với các ví dụ được chọn (dữ liệu dưới đây có thể là kết quả từ thí nghiệm đơn lẻ hoặc giá trị trung bình của hai hoặc hơn hai thí nghiệm):

Bảng D

Ví dụ	LogD Độ pH 7,4	Liên kết protein huyết tương người (% tự do)	Độ hòa tan (µM)
1	3,4	8,3	379
2	2,6	28	217
3	2,5	26	>941
4	2,7	21	991
5	3,3	8,6	297
6	2,4	34	>947
7	3,5	11	470
8	4,4	0,99	90
9	1	21	>1000
10	2,8	23	634
11	3,9	2	186
12	3,9	2,7	77
13	4	6,4	78
14	2,6	16	897
15	2,5	34	821
16	2	64	982
17	2,9	23	833
18	2,6	34	910
19	3,7	4,3	152
20	2,8	29	730
21	3,1	12	634
22	4	4,6	70
23	3,1	9,5	339
25	2,5	40	964
26	3	22	258
27	3,8	3,8	229
28	3,6	6	150
29	3	16	779

30	3	16	754
31	2	44	>942
32	3,5	6,5	692
33	3,6	5,4	466
34	3,2	15	471
37	2,6	25	961
38	3,1	13	794
39	3,7	6,8	257
40	3,5	6,4	479
41	4,1	2,2	120
42	2,4	NT	712
44	3,2	10	998
45	3,9	6,2	172
46	2,5	31	>1000
47	2,6	NT	>1000
48	3,1	10	582
49	3,8	NT	163
50	2,1	NT	748
51	2,7	28	>1000
52	3	19	864
53	3,2	11	691
54	1,4	57	>1000
55	2,1	NT	987
56	3,6	NT	377
57	2,9	NT	615
58	2,4	NT	633
59	2,4	33	971
60	2,5	23	593
61	2,7	29	848
62	2,8	19	784
63	3,2	10	870
64	3,2	14	474
65	2,4	NT	790
66	2,3	NT	931
67	2,7	19	914
68	2,4	37	561
69	2,9	37	>1000
70	2,9	24	857
71	3,2	NT	666
72	3,3	14	738
73	3	22	925

NT = không được thử nghiệm

Thử nghiệm liên kết hERG

Kênh kali hERG (gen liên quan đến ether go go ở người) là thiết yếu đối với

hoạt động điện bình thường ở tim. Loạn nhịp tim có thể gây ra bởi sự phong bế của kênh hERG bằng nhóm thuốc đa dạng. Tác dụng phụ này là nguyên nhân phổ biến đối với sự thất bại của thuốc trong các thử nghiệm an toàn tiền lâm sàng [Sanguinetti et al., Nature., 2006, 440, 463-469.] và do đó việc giảm thiểu hoạt tính phong bế kênh hERG có thể là tính chất mong muốn đối với các ứng viên thuốc.

Mục đích của thử nghiệm liên kết hERG là để đánh giá tác dụng của các hợp chất thử nghiệm lên kênh kali phụ thuộc điện áp được mã hóa bởi gen liên quan đến ether go go ở người (hERG) bằng cách sử dụng dòng tế bào CHO biểu hiện cấu trúc trên hệ thống kẹp miếng dán tự động Nanion Syncropatch 384PE.

Thử nghiệm được thực hiện như sau với tất cả các chất phản ứng được sử dụng ở nhiệt độ trong phòng trừ khi có chỉ dẫn khác.

Chế phẩm chất phản ứng bao gồm:

1. Dung dịch "IC700" bên trong được sử dụng để làm ngập đáy của chip (theo mM), KF 130, KCl 20, MgCl2 1, EGTA 10 và HEPES 10, (đều của Sigma-Aldrich; độ pH 7,2–7,3 bằng cách sử dụng KOH 10 M, 320 mOsm) và có bổ sung 25 μM escin.

2. Chất đệm bên ngoài và tế bào (theo mM), NaCl 137, KCl 4, HEPES 10, D-Glucoza 10, CaCl2 2, MgCl2 1 (độ pH 7,4, NaOH).

3. Chất đệm "tham chiếu" NMDG được sử dụng để thiết lập đường cơ sở ổn định trước khi bổ sung các hợp chất thử nghiệm, NaCl 80, KCl 4, CaCl2 2, MgCl2 1, NMDG Cl 60, D-Glucoza monohyđrat 5, HEPES 10 (độ pH 7,4 NaOH 298 mOsm)

4. Chất tăng cường độ kín được sử dụng để cải thiện chất lượng bịt kín của tế bào, NaCl 80, KCl 3, CaCl2 10, HEPES 10, MgCl2 1 (độ pH 7,4 NaOH)

Điều chế tế bào:

1. Nếu sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào; tế bào cần được ủ ở nhiệt độ 30°C trong xấp xỉ 4-6 ngày trước khi sử dụng. Ngày thử nghiệm lấy tế bào bằng cách sử dụng accutaza và tái tạo huyền phù trong 20 ml chất đệm tế bào đến mật độ từ 0,8 đến 1e6 tế bào/ml.

2. Nếu sử dụng ống cryovial sẵn sàng để thử nghiệm; rã đông nhanh hai ống

cryovial ở nhiệt độ 37°C và nhỏ bằng pipet từ từ vào 23 ml dung dịch bên ngoài.

3. Tất cả các chế phẩm tế bào cần được ủ trong thời gian 15 phút trên buồng tế bào lắc được đặt ở 10°C trước khi bắt đầu thử nghiệm.

Điều chế hợp chất:

Tất cả các hợp chất được phân tán bằng âm thanh trong bốn bản sao bằng cách sử dụng Labcyte Echo. Dung dịch dự trữ 10 mM được sử dụng để tạo ra 6 đĩa nguồn hợp chất mỗi đĩa ở nồng độ khác nhau để cho phép dùng liều lượng tích lũy lên tế bào (0,03167 mM, sau đó là 0,1 mM, sau đó 0,3167 mM, 1 mM, 3,167 mM, 10 mM). 90 µl chất đệm tham chiếu được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa nguồn chứa 600 nl của hợp chất để có nồng độ hợp chất cuối cùng lần lượt là 0,1 µM, 0,39 µM, 1,2 µM, 3,9 µM, 12,5 µM và 39,6 µM.

Thử nghiệm hERG (tất cả các bước phân tán được thực hiện bằng cách sử dụng thiết lập xử lý dịch lỏng trên Nanion syncropatch)

1. Rót vào chip 4 lỗ kháng môi trường 384 giếng bằng 40 µl chất đệm ngoài và chất đệm trong vào đáy của đĩa.

2. Phân tán 20 µl tế bào vào mỗi giếng của chip sau đó là 20 µl chất tăng cường độ kín.

3. Lấy 40 µl chất phản ứng từ mỗi giếng đến trạm rửa, để lại thể tích dư bằng 40 µl.

4. Phân tán 40 µl chất đệm tham chiếu với bước loại bỏ 40 µl sau 3 phút, lặp lại bước này.

5. Phân tán 40 µl đĩa hợp chất 1 (0,03167 mM), ghi lại 'thời gian thực' để phơi nhiễm 3 phút trước khi loại bỏ 40 µl. Lặp lại bước này đối với 5 đĩa hợp chất tiếp theo nữa ở nồng độ tăng dần để tạo ra đường cong tác dụng nồng độ tích lũy trong mỗi giếng của chip Syncropatch.

Dòng điện qua trung gian hERG được gây ra bằng cách sử dụng quy trình bước điện áp gồm có điện áp giữ liên tục bằng -80 mV, với bước 500 ms đến 60 mV sau đó là bước 500 ms đến -40 mV sau mỗi 15 giây. Độ lớn dòng điện hERG được đo tự động từ vết đã trừ độ rò bằng phần mềm Nanion bằng cách lấy đỉnh của dòng điện "đuôi" hERG ở -40 mV sau mỗi 15 giây và lấy ba đáp ứng cuối cùng trong số các đáp ứng này đối với mỗi nồng độ để tạo ra đường cong tác dụng

nồng độ.

Việc tính kết quả được thực hiện bằng cách sử dụng gói APC trong Genedata. Để chuẩn hóa thông thường dữ liệu giếng với các nhóm giếng đối chứng trung tính và chất ức chế làm tham chiếu, GeneData Assay Analyzer sử dụng công thức sau đây để chuẩn hóa các giá trị tín hiệu đến khoảng tín hiệu mong muốn:

$$N(x) = CR + \frac{x - \langle cr \rangle}{\langle sr \rangle - \langle cr \rangle} (SR - CR)$$

x là giá trị tín hiệu thô đo được của giếng

<cr> là trung vị của các giá trị tín hiệu đo được đối với giếng tham chiếu trung tâm (Trung tính) trên đĩa

<sr> là trung vị của các giá trị tín hiệu đo được đối với giếng tham chiếu thang đo (Chất ức chế) trên đĩa

CR là giá trị chuẩn hóa trung vị mong muốn đối với tham chiếu trung tâm (Trung tính)

SR là giá trị chuẩn hóa trung vị mong muốn đối với tham chiếu thang đo (Chất ức chế)

Bảng E thể hiện dữ liệu liên kết hERG đối với các ví dụ được chọn (dữ liệu dưới đây có thể là kết quả từ thí nghiệm đơn lẻ hoặc giá trị trung bình của hai hoặc hơn hai thí nghiệm):

Bảng E

Ví dụ	IC_{50} hERG (μM)	Ví dụ	IC_{50} hERG (μM)
1	10	41	6,5
2	>40	42	7,9
3	>36	45	4,2
4	17	46	>40
5	13	49	8,2
6	9,1	50	13
16	>40	51	9,1
17	22	52	2
18	>38	55	>40
19	5,4	57	16
21	5,3	58	>40
25	28	59	>40
27	7,9	60	11

28	7,8	61	>40
29	27	62	>40
30	>33	63	13
31	>40	64	13
32	14	65	31
33	14	66	26
34	7,7	67	14
37	20	68	>40
38	18	69	24
39	14	70	24
40	4,5	73	12

Khả năng thấm

Để tối đa hóa độ hấp thụ qua đường miệng, thuốc phải có dòng xuyên màng đủ cũng như là tránh sự thoát dòng bởi P-glycoprotein. Hệ thống được sử dụng rộng rãi nhất để dự đoán độ hấp thụ qua đường miệng là bằng cách xác định tốc độ thấm của các hợp chất thông qua đơn lớp của dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến đại tràng người Caco-2.

Khả năng thấm hai chiều của Caco-2 từ A đến B và từ B đến A

Thử nghiệm tự động được sử dụng để xác định khả năng thấm hai chiều (sự thoát dòng và sự hấp thụ) của các hợp chất ở tế bào Caco-2 được thực hiện trong 2 giờ ở độ độ pH 7,4. Các mẫu được phân tích thông qua LC/MS/MS để ước tính hệ số khả năng thấm biểu kiến (Papp) của các hợp chất qua đơn lớp tế bào Caco-2 và kết quả được nêu theo đơn vị $x10^{-6}$ cm/giây.

Tỉ lệ thoát dòng (ER) có thể được xác định bằng cách sử dụng công thức sau đây:

$$ER = P_{app\ (B\text{-}A)} / P_{app\ (A\text{-}B)}$$

Trong đó $P_{app\ (B\text{-}A)}$ chỉ ra hệ số khả năng thấm biểu kiến theo hướng từ phía đáy đến đỉnh, và $P_{app\ (A\text{-}B)}$ chỉ ra hệ số khả năng thấm biểu kiến theo hướng từ đỉnh đến phía đáy.

Khả năng thấm chủ động Caco-2 người Papp từ A đến B

Thử nghiệm tự động được sử dụng để xác định khả năng thấm chủ động của các hợp chất ở đơn lớp tế bào Caco-2 được thực hiện trong 2 giờ với độ pH đỉnh bằng 6,5 và độ pH đáy bằng 7,4. Thử nghiệm ức chế Caco-2 AB được thực

hiện với sự ức chế hóa học của ba chất vận chuyển thoát dòng chính ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) và ABCC2 (MRP2) ở tế bào Caco-2. Việc ủ cả đỉnh và bên được thực hiện với hỗn hợp của chất ức chế (quiniđin 50 μM, sulfasalazin 20 μM và benzbromaron 100 μM). Các mẫu được phân tích thông qua LC/MS/MS để ước tính hệ số khả năng thấm biểu kiến (Papp) của các hợp chất qua đơn lớp tế bào Caco-2 và kết quả được nêu theo đơn vị $x10^{-6}$ cm/giây.

Bảng F thể hiện dữ liệu về khả năng thấm được tạo ra đối với các ví dụ được chọn (dữ liệu dưới đây có thể là kết quả từ thí nghiệm đơn lẻ hoặc giá trị trung bình của hai hoặc hơn hai thí nghiệm):

Bảng F

Ví dụ	Papp Caco-2 hai chiều ($x10^{-6}$ cm/giây)	Caco-2 hai chiều Tỉ lệ thoát dòng	Chủ động Papp Caco-2 ($x10^{-6}$ cm/giây)
1	0,9	9,4	NT
2	3,9	8,4	NT
3	2,3	9,2	NT
6	0,9	28	1,8
11	1,6	1,4	NT
16	1,6	9,7	1,7
17	4,7	5,5	13,3
19	4,2	2,6	NT
21	4,0	1,6	14,1
25	5,0	7,4	5,9
27	5,4	0,9	NT
28	1,2	3,8	24
29	12	0,9	24
30	2,7	7,8	NT
31	0,9	9,4	NT
32	3,4	1,5	NT
33	2,6	1,5	NT
47	18	1,1	NT
60	0,7	34	NT
64	2,0	5,6	NT

NT = không được thử nghiệm

Hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài MCF7 gốc ở người ở chuột

Để xác định tác dụng của Ví dụ 17 lên sự phát triển của mảnh ghép khác loài MCF7, nghiên cứu sau đây được thực hiện. Tế bào MCF7 (ATCC) được sinh trưởng in vitro trong pha hàm mũ trước khi cấy. Một cách vắn tắt, chuột SCID

đực nặng 18 g hoặc nặng hơn (Envigo UK) được cấy dưới da trên lưng bằng viên estrogen (0,5 mg, giải phóng 21 ngày từ Innovative Research of America) trong tình trạng gây mê có thể phục hồi. Một ngày sau các con chuột được cấy dưới da trên sườn trái bằng 5 triệu tế bào MCF7, đã được điều chế dưới dạng 0,1 ml huyền phù tế bào trong RPMI (Gibco, Life Technologies) và matrigel (Corning) 1:1. Khi khối u đạt ~250 mm^3 các con chuột được phân ngẫu nhiên vào các nhóm có 9 con chuột (12 con chuột cho đối chứng tá dược lỏng) và bắt đầu tiếp nhận việc điều trị bằng thuốc. Các hợp chất được điều chế trong tá dược lỏng (40% Tetraetylen Glycol (thể tích/thể tích), 7,5% Captisol (khối lượng/thể tích) trong nước để tiêm) và cung cấp theo đường miệng ở thể tích bằng 10 ml/kg một lần một ngày trong thời gian 21 ngày ở liều lượng từ 0,5 mg/kg đến 50 mg/kg. Đo khối u hai lần một tuần và tính thể tích khối u bằng cách sử dụng công thức elip (pi/6 x chiều rộng x chiều rộng x chiều dài). Dữ liệu thể hiện số trung bình nhân của thể tích khối u so với thể tích khối u vào ngày phân nhóm ngẫu nhiên. Thanh sai số là khoảng tin cậy 95% (Graphpad Prism). Nghiên cứu này chứng minh rằng liều lượng bằng 10 mg/kg và lớn hơn mang lại sự thoái triển khối u (Hình 12).

Hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài MCF7 đột biến Y537S ESR1 của người ở chuột

Để xác định tác dụng của Ví dụ 17 lên sự phát triển của mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ tế bào MCF7 được thiết kế di truyền để biểu hiện Y537S ESR1, nghiên cứu sau đây được thực hiện. Tế bào MCF7 Y537S ESR1 được tạo ra bằng cách biên tập hệ gen và chỉ biểu hiện Y537S ESR1 (Ladd, et al., Oncotarget, 2016, 7:54120-54136). Một cách vắn tắt, chuột SCID đực nặng 18 g hoặc hơn (Envigo UK) được cấy dưới da trên sườn trái bằng 5 triệu tế bào MCF7 Y537S ESR1, đã được chuẩn bị 0,1 ml huyền phù tế bào trong RPMI (Gibco, Life Technologies) và matrigel (Corning) 1:1. Khi khối u đạt ~250 mm^3 các con chuột được phân ngẫu nhiên vào các nhóm có 9 con chuột (12 con chuột cho đối chứng tá dược lỏng) và bắt đầu tiếp nhận việc điều trị bằng thuốc. Các hợp chất được điều chế trong tá dược lỏng (40% Tetraetylen Glycol (thể tích/thể tích), 7,5% Captisol (khối lượng/thể tích) trong nước để tiêm) và cung cấp theo đường miệng ở thể tích bằng 10 ml/kg một lần một ngày trong thời gian 22 ngày ở liều lượng từ

0,5 mg/kg đến 50 mg/kg. Đo khối u hai lần một tuần và tính thể tích khối u bằng cách sử dụng công thức elip (pi/6 x chiều rộng x chiều rộng x chiều dài). Dữ liệu thể hiện số trung bình nhân của thể tích khối u so với thể tích khối u vào ngày phân nhóm ngẫu nhiên. Thanh sai số là khoảng tin cậy 95% (Graphpad Prism). Nghiên cứu này chứng minh rằng liều lượng bằng 10 mg/kg và lớn hơn mang lại sự thoái triển khối u (Hình 13).

Hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 CTC174 của người ở chuột

Để xác định tác dụng của Ví dụ 17 lên sự phát triển của mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân đột biến ESR1 CTC174, con chuột NSG cái được cấy bằng mảnh của CTC174 trong vùng đệm mỡ vú. CTC174 có nguồn gốc từ tế bào khối u tuần hoàn được phân lập từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú ER+ di căn và đã được chứng minh là mang đột biến D538G trong ESR1 ở tần số alen 0,33 (Ladd, et al., Oncotarget, 2016, 7:54120-54136). Một cách vắn tắt, con chuột NOD/SCID (Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (NSG) đã cắt bỏ buồng trứng cái (tuổi 6-7 tuần - The Jackson Laboratory) được cấy trong tình trạng gây mê có thể phục hồi bằng mảnh ~50 mm^3 của mảnh ghép khác loài CTC174 trong vùng đệm mỡ vú thứ ba. Khi khối u đạt ~200 mm^3 các con chuột được phân ngẫu nhiên vào các nhóm có 10 con chuột và bắt đầu tiếp nhận việc điều trị bằng thuốc. Các hợp chất được điều chế trong tá dược lỏng (40% Tetraetylen Glycol (thể tích/thể tích), 7,5% Captisol (khối lượng/thể tích) trong nước để tiêm) và cung cấp theo đường miệng ở thể tích bằng 10 ml/kg một lần một ngày trong thời gian 32 ngày ở liều lượng từ 0,8 mg/kg đến 40 mg/kg. Đo khối u hai lần một tuần và tính thể tích khối u bằng cách sử dụng công thức elip (pi/6 x chiều rộng x chiều rộng x chiều dài).

Dữ liệu thể hiện số trung bình nhân của thể tích khối u so với thể tích khối u vào ngày phân nhóm ngẫu nhiên. Thanh sai số là khoảng tin cậy 95% (Graphpad Prism). Nghiên cứu này chứng minh rằng liều lượng bằng 10 mg/kg và lớn hơn mang lại sự ức chế phát triển khối u gần như hoàn toàn (Hình 14).

Hiệu quả kết hợp thuốc kháng khối u mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người CTC174 ở chuột

Để xác định tác dụng của Ví dụ 17 lên sự phát triển của mảnh ghép khác loài

có nguồn gốc từ bệnh nhân đột biến ESR1 CTC174 kết hợp với chất ức chế CDK4/6 palbociclib hoặc chất ức chế mTORC1/2 vistusertib (AZD2014), con chuột NSG cái được cấy bằng mảnh của CTC174 trong vùng đệm mỡ vú. CTC174 có nguồn gốc từ tế bào khối u tuần hoàn được phân lập từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú ER+ di căn và đã được chứng minh là mang đột biến D538G trong ESR1 ở tần số alen 0,33 (Ladd, et al., Oncotarget, 2016, 7:54120-54136). Một cách vắn tắt, con chuột NOD/SCID (Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (NSG) cái (tuổi 6-7 tuần - The Jackson Laboratory) được cấy trong tình trạng gây mê có thể phục hồi bằng mảnh ~30 mm3 của mảnh ghép khác loài CTC174 trong vùng đệm mỡ vú thứ ba. Khi khối u đạt ~500 mm3 các con chuột được phân ngẫu nhiên vào các nhóm có 10 con chuột và bắt đầu tiếp nhận việc điều trị bằng thuốc. Ví dụ 17 được điều chế trong tá dược lỏng (40% Tetraetylen Glycol (thể tích/thể tích), 7,5% Captisol (khối lượng/thể tích) trong nước để tiêm) và cung cấp theo đường miệng ở thể tích bằng 10 ml/kg một lần một ngày trong thời gian 23 ngày ở liều lượng 10 mg/kg. Palbociclib và vistusertib được điều chế trong tá dược lỏng (1% polysorbate 80). Palbociclib được cung cấp theo đường miệng ở thể tích bằng 10 ml/kg một lần một ngày trong thời gian 23 ngày ở liều lượng 50 mg/kg. Vistusertib được cung cấp theo đường miệng ở thể tích bằng 10 ml/kg hai lần một ngày theo kế hoạch 2 ngày đóng, 5 ngày ngắt trong thời gian 23 ngày ở liều lượng 10 mg/kg. Nhóm được điều trị bằng tá dược lỏng được dùng liều lượng với 10 ml/kg 40% Tetraetylen Glycol (thể tích/thể tích), 7,5% Captisol (khối lượng/thể tích) trong nước để tiêm theo đường miệng một lần một ngày trong thời gian 23 ngày. Đo khối u hai lần một tuần và tính thể tích khối u bằng cách sử dụng công thức elip (pi/6 x chiều rộng x chiều rộng x chiều dài). Dữ liệu thể hiện số trung bình nhân của thể tích khối u so với thể tích khối u vào ngày phân nhóm ngẫu nhiên. Thanh sai số là khoảng tin cậy 95% (Graphpad Prism). Nghiên cứu này chứng minh rằng Ví dụ 17 kết hợp với palbociclib (Hình 15) hoặc với vistusertib (AZD2014) (Hình 16) mang lại tác dụng lớn hơn so với một trong hai chất được dùng một mình.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm, mà có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng

của chúng, như xác định ở trên kết hợp với tá dược dược dụng.

Tá dược dược dụng thích hợp cho chế phẩm viên nén bao gồm, ví dụ, chất pha loãng trơ, chất tạo hạt và làm tan rã, chất gắn kết, chất làm trõn, chất bảo quản và chất chống oxy hóa. Tá dược dược dụng dụng thích hợp khác có thể là chất càng hóa. Chế phẩm viên nén có thể không được phủ hoặc được phủ để cải biến sự phân rã của chúng và sự hấp thụ tiếp theo của thành phần hoạt tính trong đường dạ dày ruột, hoặc để cải thiện độ ổn định và/hoặc bề ngoài của chúng, trong một trong các trường hợp, bằng cách sử dụng các chất và quy trình phủ thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực.

Hợp phần để dùng qua đường miệng theo cách khác có thể ở dạng viên nang gelatin cứng trong đó thành phần hoạt tính được trộn với chất pha loãng rắn trơ, hoặc dưới dạng viên nang gelatin mềm trong đó thành phần hoạt tính được trộn với nước hoặc dầu.

Huyền phù trong nước thường chứa thành phần hoạt tính ở dạng bột mịn cùng với một hoặc nhiều chất tạo huyền phù, chất phân tán hoặc làm ẩm. Huyền phù trong nước cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất tạo màu, chất tạo vị, và/hoặc chất làm ngọt.

Huyền phù trong dầu có thể được tạo chế phẩm bằng cách tạo huyền phù thành phần hoạt tính trong dầu thực vật hoặc trong dầu khoáng. Huyền phù trong dầu cũng có thể chứa chất làm đặc. Chất làm ngọt chẳng hạn như các chất nêu ở trên, và chất tạo vị có thể được bổ sung để tạo ra chế phẩm dùng qua đường miệng ngon. Các hợp phần này có thể được bảo quản bằng cách bổ sung chất chống oxy hóa.

Bột và hạt phân tán thích hợp để điều chế huyền phù trong nước bằng cách bổ sung nước thường chứa thành phần hoạt tính cùng với chất phân tán hoặc chất làm ẩm, chất tạo huyền phù và một hoặc nhiều chất bảo quản. Các tá dược khác nữa chẳng hạn như chất làm ngọt, chất tạo vị và chất tạo màu, cũng có thể có mặt.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Pha dầu có thể là dầu thực vật hoặc dầu khoáng hoặc hỗn hợp của chất bất kỳ trong số chúng. Nhũ tương cũng có thể chứa chất làm ngọt, chất tạo vị và chất bảo quản.

Sirô và cồn ngọt có thể được tạo chế phẩm với chất làm ngọt, và cũng có thể chứa chất làm dịu, chất bảo quản, chất tạo vị và/hoặc chất tạo màu.

Dược phẩm cũng có thể ở dạng huyền phù trong nước hoặc trong dầu tiêm được tiệt trùng, mà có thể được tạo chế phẩm theo quy trình đã biết bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất phân tán hoặc làm ẩm và chất tạo huyền phù thích hợp, mà đã được đề cập đến ở trên. Chế phẩm tiêm được tiệt trùng cũng có thể là dung dịch hoặc huyền phù tiêm được tiệt trùng trong hệ thống chất pha loãng hoặc dung môi chấp nhận được dùng ngoài đường tiêu hóa không độc.

Các hợp phần để dùng bằng cách xông có thể ở dạng sol khí nén thông thường được bố trí để phân tán thành phần hoạt tính dưới dạng sol khí chứa giọt rắn hoặc lỏng chia nhỏ. Chất đẩy sol khí thông thường chẳng hạn như hyđrocacbon được flo hóa dễ bay hơi hoặc hyđrocacbon có thể được sử dụng và thiết bị sol khí được bố trí theo cách thuận tiện để phân tán lượng đã được đo của thành phần hoạt tính. Dụng cụ xông bột khô cũng có thể thích hợp.

Thông tin thêm về việc tạo chế phẩm có thể tham khảo ở Chương 25.2 của Tập 5 của tài liệu Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Lượng thành phần hoạt tính mà được kết hợp với một hoặc nhiều tá dược để tạo ra dạng liều lượng đơn lẻ sẽ cần thay đổi tùy thuộc vào vật chủ được điều trị và đường dùng cụ thể. Ví dụ, việc dùng theo đường miệng cho người thường đòi hỏi, ví dụ, từ 1 mg đến 2 g hoạt chất (thích hợp hơn là từ 100mg đến 2g, ví dụ từ 250 mg đến 1,8g, chẳng hạn như từ 500mg đến 1,8g, cụ thể là từ 500mg đến 1,5g, thuận lợi là từ 500mg đến 1g) để dùng hợp chất với lượng thích hợp và thuận tiện của tá dược mà có thể thay đổi từ khoảng 3 đến khoảng 98 phần trăm theo khối lượng của toàn bộ hợp phần. Cần hiểu rằng, nếu liều lượng lớn là cần thiết, nhiều dạng liều lượng có thể cần thiết, ví dụ hai hoặc nhiều viên nén hoặc viên nang, với liều lượng của thành phần hoạt tính được chia một cách thuận lợi là ở giữa chúng. Thông thường, dạng liều đơn vị sẽ chứa khoảng từ 10 mg đến 0,5 g hợp chất theo sáng chế, mặc dù dạng liều đơn vị có thể chứa lên đến 1g. Thuận lợi là, dạng liều rắn đơn lẻ có thể chứa từ 1 đến 300mg thành phần hoạt tính.

Kích thước của liều lượng cho mục đích trị liệu hoặc phòng ngừa của hợp

chất theo sáng chế sẽ thay đổi tự nhiên theo bản chất và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, tuổi và giới tính của động vật hoặc bệnh nhân và đường dùng, theo nguyên tắc y tế đã biết rõ.

Khi sử dụng hợp chất theo sáng chế cho mục đích trị liệu hoặc phòng ngừa nó thường được dùng sao cho liều lượng mỗi ngày nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1 mg/kg đến 100 mg/kg khối lượng cơ thể được tiếp nhận, được cung cấp ở các liều lượng chia nhỏ nếu cần. Nhìn chung, liều lượng thấp hơn được dùng khi dùng cho đường ngoài đường tiêu hóa. Do đó, ví dụ, để dùng trong tĩnh mạch, liều lượng nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1 mg/kg đến 25 mg/kg khối lượng cơ thể thường được sử dụng. Tương tự, để dùng bằng cách xông, liều lượng nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1 mg/kg đến 25 mg/kg khối lượng cơ thể sẽ được sử dụng. Tuy nhiên, việc dùng theo đường miệng được ưu tiên, cụ thể là ở dạng viên nén.

Theo một khía cạnh của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế hoặc muối dược dụng của chúng, được dùng dưới dạng viên nén có chứa từ 10mg đến 100mg hợp chất theo sáng chế (hoặc muối dược dụng của chúng), trong đó một hoặc nhiều viên nén được dùng như yêu cầu để đạt được liều lượng mong muốn.

Như nêu trên, đã biết rằng việc truyền tín hiệu qua ERα gây ra sự tạo khối u bởi một hoặc nhiều của tác dụng làm trung gian cho sự tăng sinh của tế bào ung thư và tế bào khác, làm trung gian cho sự kiện tạo mạch và làm trung gian cho sự di động, sự di chuyển và sự xâm lấn của tế bào ung thư. Chúng tôi đã phát hiện ra rằng hợp chất theo sáng chế có hoạt tính kháng khối u có hiệu lực mà được tin là đạt được bằng sự đối kháng và sự điều hòa giảm của ERα mà tham gia vào các bước truyền tín hiệu mà dẫn đến sự tăng sinh và sự sống sót của tế bào khối u và khả năng xâm lấn và di chuyển của tế bào khối u di căn.

Theo đó, hợp chất theo sáng chế có thể có giá trị làm chất kháng khối u, cụ thể là làm chất ức chế chọn lọc của sự tăng sinh, sự sống sót, sự di động, sự phân tán và sự xâm lấn của tế bào ung thư động vật có vú dẫn đến sự ức chế của sự phát triển khối u và sự sống sót và dẫn đến sự ức chế của sự phát triển khối u di căn. Cụ thể là, hợp chất theo sáng chế có thể có giá trị làm chất chống tăng sinh và chống xâm lấn trong sự ngăn chặn và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn. Cụ thể là, hợp chất theo sáng chế có thể hữu dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các khối u

mà nhạy cảm đối với sự ức chế của ERα và mà tham gia vào các bước truyền tín hiệu mà dẫn đến sự tăng sinh và sự sống sót của tế bào khối u và khả năng di chuyển và sự xâm lấn của tế bào khối u di căn. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể hữu dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị khối u mà được làm trung gian một mình hoặc một phần bởi sự đối kháng và sự điều hòa giảm của ERα, tức là hợp chất có thể được sử dụng để tạo ra tác dụng ức chế ERα ở động vật máu nóng cần sự điều trị này.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sử dụng làm thuốc ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sử dụng trong việc tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sử dụng ở động vật máu nóng chẳng hạn như người làm chất chống xâm lấn trong sự ngăn chặn và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc sản xuất tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng ở động vật máu nóng chẳng hạn như người làm chất chống xâm lấn trong sự ngăn chặn và/hoặc điều trị bệnh khối u rắn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tác dụng chống tăng sinh ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tác dụng chống xâm lấn bằng sự ngăn chặn và/hoặc việc điều trị bệnh khối u rắnng vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh khối u rắn ở động vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh khối u rắnng vật máu nóng chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh khối u rắnng vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các khối u mà nhạy cảm với sự ức chế của ERα mà tham gia vào các bước truyền tín hiệu mà dẫn đến sự tăng sinh, sự sống sót, sự xâm lấn và khả năng di chuyển của tế bào khối u.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị các khối u mà nhạy cảm với sự ức chế của ERα mà tham gia vào các bước truyền tín hiệu mà dẫn đến sự tăng sinh, sự sống sót, sự xâm lấn và khả năng di chuyển của tế bào khối u.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị các khối u mà nhạy cảm với sự ức chế của ERα mà tham gia vào các bước truyền tín hiệu mà dẫn đến sự tăng sinh, sự sống sót, sự xâm lấn và khả năng di chuyển của tế bào khối u mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sử dụng trong việc tạo ra tác dụng ức chế trên ERα.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc tạo ra tác dụng ức chế trên ERα.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra tác dụng ức chế trên ERα mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có

công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc tạo ra tác dụng ức chế chọn lọc trên ERα.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc tạo ra tác dụng ức chế chọn lọc trên ERα.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra tác dụng ức chế chọn lọc trên ERα mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Được mô tả trong bản mô tả này là các hợp chất mà có thể liên kết với miền liên kết phối tử ERα và là chất làm thoái biến thụ thể estrogen chọn lọc. Trong các thử nghiệm dựa trên hóa sinh và tế bào các hợp chất theo sáng chế được thể hiện là chất gắn kết thụ thể estrogen có hiệu lực và làm giảm hàm lượng trong tế bào của ERα và do đó có thể hữu dụng trong việc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh nhạy cảm estrogen (bao gồm các bện mà phát triển tính kháng đối với liệu pháp nội tiết), tức là để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư của vú và bệnh ung thư phụ khoa (bao gồm nội mạc tử cung, buồng trứng và cổ tử cung) và bệnh ung thư biểu hiện protein đột biến ERα mà có thể là các đột biến de novo hoặc phát sinh dưới dạng kết quả của việc điều trị bằng liệu pháp nội tiết trước đây chẳng hạn như chất ức chế aromataza.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư của vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư của vú.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư của vú, trong đó bệnh ung thư có phát triển tính kháng đối với một hoặc nhiều liệu pháp nội tiết khác.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa, mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư của vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư vú, mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư vú, trong đó bệnh ung thư có phát triển tính kháng đối với một hoặc nhiều liệu pháp nội tiết khác, mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư của

vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú, trong đó bệnh ung thư có phát triển tính kháng đối với một hoặc nhiều liệu pháp nội tiết khác.

Theo một dấu hiệu của sáng chế, bệnh ung thư cần điều trị là bệnh ung thư vú. Theo khía cạnh khác của dấu hiệu này, bệnh ung thư vú là Thụ Thể Estrogen +ve (ER+ve). Theo một phương án của khía cạnh này, hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), được dùng liều lượng kết hợp với chất chống ung thư khác, chẳng hạn như chất kháng hormon như xác định trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú ER+ve.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư vú ER+ve, mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như xác định ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, như được xác định trong bản mô tả này trước khi để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú ER+ve.

Như nêu trên, tác dụng *in-vivo* của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) có thể được gây ra một phần bởi một hoặc nhiều chất chuyển hóa mà được tạo thành ở trong cơ thể người hoặc động vật sau khi dùng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID).

Do đó sáng chế cũng bao gồm phương pháp ức chế ER-α ở bệnh nhân, bao gồm bước dùng cho bệnh nhân lượng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC)

hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, hữu hiệu trong việc ức chế ER-α ở bệnh nhân.

Do đó sáng chế cũng bao gồm phương pháp ức chế ER-α ở bệnh nhân, bao gồm bước dùng cho bệnh nhân lượng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, hữu hiệu trong việc ức chế ER-α ở bệnh nhân.

Việc điều trị chống ung thư được xác định trong bản mô tả này có thể được áp dụng dưới dạng liệu pháp duy nhất hoặc có thể bao gồm, ngoài hợp chất theo sáng chế, phẫu thuật hoặc xạ trị hoặc hóa trị thông thường. Hóa trị này có thể bao gồm một hoặc nhiều loại chất kháng khối u sau đây:

(i) thuốc chống tăng sinh/chống tạo khối u khác và dược phẩm kết hợp của chúng, như được sử dụng trong ngành ung thư, chẳng hạn như chất alkyl hóa (ví dụ cis-platin, oxaliplatin, carboplatin, xyclophosphamit, mù tạc nitơ, melphalan, clorambuxil, busulphan, temozolamit và nitrosoure); chất chống chuyển hóa (ví dụ gemxitabin và kháng folat chẳng hạn như flopyrimiđin như 5-flouraxin và tegafur, raltitrexed, methotrexat, xytosin arabinosit, và hyđroxyure); chất kháng sinh kháng khối u (ví dụ anthraxyclin như ađriamyxin, bleomyxin, đoxorubixin, đaunomyxin, epirubixin, iđarubixin, mitomyxin-C, đactinomyxin và mithramyxin); chất chống phân bào (ví dụ vinca alkaloit như vincristin, vinblastin, vindesin và vinorelbin và taxoit như taxol và taxoter và chất ức chế polokinaza); và chất ức chế topoisomeraza (ví dụ epipođophyllotoxin như etoposit và teniposit, amsacrin, topotecan và camptothexin);

(ii) chất kháng hormon chẳng hạn như kháng oestrogen (ví dụ như tamoxifen, fulvestrant, toremifen, raloxifen, đroloxifen và iođoxyfen), progestogen (ví dụ như megestrol axetat), chất ức chế aromataza (ví dụ như anastrozol, letrozol, vorazol và exemestan);

(iii) chất ức chế của chức năng yếu tố sinh trưởng và các con đường truyền tín hiệu xuôi dòng của chúng: được bao gồm là chất điều biến Ab của đích thụ thể yếu tố sinh trưởng hoặc yếu tố sinh trưởng bất kỳ, được đánh giá bởi Stern *et al.* Critical Reviews in Oncology/Haematology, 2005, 54, pp11-29); cũng được bao gồm là chất ức chế phân tử nhỏ của các đích này, ví dụ như chất ức chế kinaza -

các ví dụ bao gồm kháng thể kháng-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], kháng thể kháng-EGFR panitumumab, kháng thể kháng-EGFR cetuximab [Erbitux, C225] và chất ức chế tyrosin kinaza bao gồm chất ức chế của họ thụ thể erbB, chẳng hạn như chất ức chế tyrosin kinaza thụ thể họ yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGFR/erbB1) chẳng hạn như gefitinib hoặc erlotinib, chất ức chế tyrosin kinaza erbB2 chẳng hạn như lapatinib, và chất ức chế erb1/2 hỗn hợp chẳng hạn như afatanib; các chiến lược tương tự đã có sẵn đối với các lớp khác của các yếu tố sinh trưởng và thụ thể của chúng, ví dụ như chất ức chế của họ yếu tố sinh trưởng tế bào gan hoặc thụ thể của chúng bao gồm c-met và ron; chất ức chế của họ insulin và yếu tố sinh trưởng insulin hoặc thụ thể của chúng (IGFR, IR) chất ức chế của họ yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu hoặc thụ thể của chúng (PDGFR), và chất ức chế của việc truyền tín hiệu qua trung gian tyrosin kinaza thụ thể khác chẳng hạn như c-kit, AnLK, và CSF-1R; cũng được bao gồm là chất điều biến mà nhắm đích protein truyền tín hiệu trong con đường truyền tín hiệu PI3-kinaza, ví dụ như, chất ức chế của đồng phân PI3-kinaza chẳng hạn như PI3K-α/β/γ và ser / thr kinaza chẳng hạn như AKT, mTOR (chẳng hạn như AZD2014), PDK, SGK, PI4K hoặc PIP5K; cũng được bao gồm là chất ức chế của serin/threonin kinaza không được liệt kê ở trên, ví dụ như chất ức chế raf chẳng hạn như vemurafenib, chất ức chế MEK chẳng hạn như selumetinib (AZD6244), chất ức chế Abl chẳng hạn như imatinib hoặc nilotinib, chất ức chế Btk chẳng hạn như ibrutinib, chất ức chế Syk chẳng hạn như fostamatinib, chất ức chế aurora kinaza (ví dụ như AZD1152), chất ức chế của ser/thr kinaza khác chẳng hạn như JAK, STAT và IRAK4, và chất ức chế kinaza phụ thuộc xyclin ví dụ như chất ức chế của CDK1, CDK7, CDK9 và CDK4/6 chẳng hạn như palbociclib;

iv) chất điều biến của con đường truyền tín hiệu hư hỏng ADN, ví dụ chất ức chế PARP (ví dụ Olaparib), chất ức chế ATR hoặc chất ức chế ATM;

v) chất điều biến của các con đường chết tế bào theo chương trình và sự chết tế bào chẳng hạn như chất điều biến họ Bcl (ví dụ ABT-263 / Navitoclax, ABT-199);

(vi) chất chống tạo mạch chẳng hạn như các chất ức chế tác dụng của yếu tố sinh trưởng nội mô mạch, [ví dụ kháng thể yếu tố sinh trưởng tế bào kháng-nội mô

mạch bevacizumab (Avastin™) và ví dụ, chất ức chế thụ thể VEGF tyrosin kinaza chẳng hạn như sorafenib, axitinib, pazopanib, sunitinib và vandetanib (và hợp chất mà hoạt động theo cơ chế khác (ví dụ linomit, chất ức chế của chức năng integrin αvβ3 và angiostatin)];

(vii) chất gây hư hỏng mạch, chẳng hạn như Combretastatin A4;

(viii) chất chống xâm lấn, ví dụ chất ức chế họ c-Src kinaza như (dasatinib, J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661) và bosutinib (SKI-606), và chất ức chế kim loại proteinaza như marimastat, chất ức chế của chức năng thụ thể chất hoạt hóa urokinaza plasminogen hoặc kháng thể đối với Heparanaza];

(ix) phương pháp trị liệu miễn dịch, bao gồm ví dụ như phương pháp ex-vivo và in-vivo để làm tăng khả năng gây miễn dịch của tế bào khối u của bệnh nhân, chẳng hạn như sự chuyển nhiễm với xytokin chẳng hạn như interleukin 2, interleukin 4 hoặc yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-đại thực bào, cách tiếp cận để làm giảm chứng mất ứng tế bào T, cách tiếp cận bằng cách sử dụng tế bào miễn dịch được chuyển nhiễm chẳng hạn như tế bào phân nhánh được chuyển nhiễm xytokin, cách tiếp cận bằng cách sử dụng dòng tế bào khối u được chuyển nhiễm xytokin, và các tiếp cận bằng cách sử dụng kháng thể kháng-iđiotyp. Ví dụ cụ thể bao gồm kháng thể đơn dòng nhắm đích PD-1 (ví dụ BMS-936558) hoặc CTLA4 (ví dụ ipilimumab và tremelimumab);

(x) liệu pháp dự trên đối nghĩa và ARNi, ví dụ liệu pháp mà được định hướng đến các đích được liệt kê.

(xi) phương pháp liệu pháp gen, bao gồm ví dụ như các phương pháp thay thế gen khác thường chẳng hạn như p53 khác thường hoặc BRCA1 hoặc BRCA2 khác thường, phương pháp GDEPT (liệu pháp tiền dược chất enzym định hướng gen) chẳng hạn như phương pháp sử dụng xytosin đeaminaza, tymiđin kinaza hoặc enzym nitroređuctaza vi khuẩn và phương pháp làm tăng khả năng dung chịu của bệnh nhân đối với việc hóa trị hoặc xạ trị chẳng hạn như liệu pháp gen kháng đa thuốc;

Theo đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất kháng khối u bổ sung để điều trị kết hợp bệnh ung thư.

Theo khía cạnh này của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm kết hợp thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng và chất kháng khối u khác, cụ thể là chất bất kỳ trong số các chất kháng khối u liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên. Cụ thể là, chất kháng khối u liệt kê ở mục (i)-(xi) ở trên là tiêu chuẩn chăm sóc đối với bệnh ung thư cụ thể cần điều trị; người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu nghĩa của "tiêu chuẩn chăm sóc".

Do đó theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất kháng khối u khác, cụ thể là chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất kháng khối u khác, cụ thể là chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong mục (i) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất bất kỳ trong số các chất kháng khối u liệt kê trong mục (i) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm kết hợp thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và taxoit, chẳng hạn như ví dụ như taxol hoặc taxoter, thường là taxoter.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất kháng khối u khác, cụ thể là chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong mục (ii) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm kết hợp thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất bất kỳ trong số các chất kháng hormon được liệt kê trong mục (ii) ở trên, ví dụ như chất bất kỳ trong số các chất kháng-oestrogen được liệt kê trong mục (ii) ở trên,

hoặc ví dụ như chất ức chế aromataza được liệt kê trong mục (ii) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm kết hợp thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế mTOR, chẳng hạn như AZD2014.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm kết hợp thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế PI3Kα, chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on, hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm kết hợp thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế CDK4/6, chẳng hạn như palbociclib.

Theo một khía cạnh dược phẩm kết hợp nêu trên của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, với chất kháng khối u được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc chất ức chế mTOR (chẳng hạn như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3K-α (chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on) hoặc chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib), thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa, chẳng hạn như bệnh ung thư của vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, cụ thể là bệnh ung thư vú, chẳng hạn như bệnh ung thư vú ER+ve.

Trong bản mô tả này, khi thuật ngữ "dạng kết hợp" được sử dụng cần hiểu rằng nó dùng để chỉ việc dùng đồng thời, riêng rẽ hoặc tuần tự. Theo một khía cạnh của sáng chế "dược phẩm kết hợp" dùng để chỉ việc dùng đồng thời. Theo khía cạnh khác của sáng chế "dược phẩm kết hợp" dùng để chỉ việc dùng riêng rẽ. Theo khía cạnh khác theo sáng chế "dược phẩm kết hợp" dùng để chỉ việc dùng tuần tự. Khi việc dùng là tuần tự hoặc riêng rẽ, việc trì hoãn dùng thành phần thứ hai không chẳng hạn như làm mất tác dụng có lợi của dạng kết hợp. Khi được

phẩm kết hợp của hai hoặc hơn hai thành phần được dùng riêng rẽ hoặc tuần tự, cần hiểu rằng phác đồ liều lượng đối với mỗi thành phần có thể khác biệt và độc lập với thành phần kia. Thường là, các hợp chất theo sáng chế được dùng một lần mỗi ngày.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên, kết hợp với tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất bất kỳ trong số các chất kháng hormon được liệt kê trong các mục (ii) ở trên, ví dụ như chất bất kỳ trong số các chất kháng-oestrogen được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc ví dụ như chất ức chế aromataza được liệt kê trong mục (ii) ở trên kết hợp với tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế mTOR, chẳng hạn như AZD2014, kết hợp với tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế PI3Kα, chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on, kết hợp với tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib) kết hợp với tá dược dược dụng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên, kết hợp với tá dược dược dụng để sử dụng trong việc điều trị

bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm mà có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất bất kỳ trong số các chất kháng hormon được liệt kê trong các mục (ii) ở trên, ví dụ như chất bất kỳ trong số các chất kháng-oestrogen được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc ví dụ như chất ức chế aromataza được liệt kê trong mục (ii) ở trên kết hợp với tá dược dược dụng để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế mTOR, chẳng hạn như AZD2014, kết hợp với tá dược dược dụng để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế PI3Kα, chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on, kết hợp với tá dược dược dụng để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, và chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib) kết hợp với tá dược dược dụng để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh dược phẩm nêu trên của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, với chất kháng khối u được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc chất ức chế mTOR (chẳng hạn như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3Kα (chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on) hoặc chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib), thích hợp để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa, chẳng hạn như bệnh ung thư của vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, cụ thể là bệnh ung thư vú, chẳng hạn như bệnh ung thư vú ER+ve.

Theo dấu hiệu khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất bất kỳ trong số các chất kháng hormon được liệt kê trong các mục (ii) ở trên, ví dụ như chất bất kỳ trong số các chất kháng-oestrogen được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc ví dụ như chất ức chế aromataza được liệt kê trong mục (ii) ở trên để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất ức chế mTOR, chẳng hạn như AZD2014, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất ức chế PI3Kα, chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on, để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib) để sản xuất thuốc để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người.

Theo một khía cạnh việc sử dụng nêu trên của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất kháng khối u được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc chất ức chế mTOR (chẳng hạn như AZD2014), hoặc chất ức chế PI3K-α (chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-

triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on) hoặc chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib), thích hợp để sử dụng để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa, chẳng hạn như bệnh ung thư của vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, cụ thể là bệnh ung thư vú, chẳng hạn như bệnh ung thư vú ER+ve.

Do đó theo dấu hiệu khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất bất kỳ trong số các chất kháng hormon được liệt kê trong các mục (ii) ở trên, ví dụ như chất bất kỳ trong số các chất kháng-oestrogen được liệt kê trong mục (ii) ở trên, hoặc ví dụ như chất ức chế aromataza được liệt kê trong mục (ii) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất ức chế mTOR, chẳng hạn như AZD2014.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất ức chế PI3Kα, chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật máu nóng, chẳng hạn như người, cần việc điều trị này mà

bao gồm bước dùng cho động vật này lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, kết hợp với chất ức chế CDK4/6 (chẳng hạn như palbociclib).

Theo một khía cạnh dược phẩm kết hợp, dược phẩm, sử dụng và phương pháp điều trị bệnh ung thư nêu trên, là phương pháp điều trị bệnh ung thư vú hoặc phụ khoa, chẳng hạn như bệnh ung thư của vú, nội mạc tử cung, buồng trứng hoặc cổ tử cung, cụ thể là bệnh ung thư vú, chẳng hạn như bệnh ung thư vú ER+ve.

Theo khía cạnh khác của sáng chế này sáng chế đề xuất bộ kit có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (xi) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế này sáng chế đề xuất bộ kit có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng kết hợp với chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) hoặc (ii) ở trên.

Theo khía cạnh khác của sáng chế này sáng chế đề xuất bộ kit có chứa:

a) hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng ở dạng liều đơn vị thứ nhất;

b) chất kháng khối u được chọn từ các chất kháng khối u liệt kê ở mục (i) – (xi) ở trên ở dạng liều đơn vị thứ hai; và

c) vật chứa để chứa dạng liều lượng thứ nhất và dạng liều lượng thứ hai này.

Theo khía cạnh khác của sáng chế này sáng chế đề xuất bộ kit có chứa:

a) hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng ở dạng liều đơn vị thứ nhất;

b) chất kháng khối u được chọn từ các chất được liệt kê trong các mục (i) – (ii) ở trên ở dạng liều đơn vị thứ hai; và

c) vật chứa để chứa dạng liều lượng thứ nhất và dạng liều lượng thứ hai này.

Theo khía cạnh khác của sáng chế này sáng chế đề xuất bộ kit có chứa:

a) hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), hoặc muối dược dụng của chúng, ở dạng liều đơn vị thứ nhất;

b) chất kháng khối u được chọn từ chất kháng khối u được liệt kê trong mục (ii) ở

trên, chất ức chế mTOR (chẳng hạn như AZD2014), chất ức chế PI3Kα, chẳng hạn như hợp chất 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-tert-butyl-1,3,4-oxađiazol-2-yl)pyrazin-2-yl)-1-etyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperiđin-1-yl)-3-hyđroxypropan-1-on, và chất ức chế CDK4/6, chẳng hạn như palbociclib, ở dạng liều đơn vị thứ hai; và

c) vật chứa để chứa dạng liều lượng thứ nhất và dạng liều lượng thứ hai này.

Liệu pháp kết hợp như được mô tả ở trên có thể được bổ sung vào phía trên của trị liệu tiêu chuẩn chăm sóc thường là được thực hiện theo kế hoạch quy định thông thường của nó.

Mặc dù các hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), chủ yếu có giá trị làm tác nhân trị liệu để sử dụng ở động vật máu nóng (bao gồm người), chúng cũng hữu dụng bất cứ khi nào cần phải ức chế ER-α. Do đó, chúng hữu dụng làm tiêu chuẩn dược để sử dụng trong việc phát triển thử nghiệm sinh học mới và trong việc tìm kiếm tác nhân dược mới.

Chăm sóc sức khỏe cá nhân hóa

Khía cạnh khác của sáng chế này dựa trên việc xác định mối liên hệ giữa tình trạng của gen mã hóa cho ERα và tính nhạy cảm tiềm năng đối với việc điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID). Cụ thể là, tình trạng gen ERα có thể chỉ ra rằng bệnh nhân ít có khả năng đáp ứng với liệu pháp hormon hiện tại (chẳng hạn như chất ức chế aromataza), một phần ít nhất là bởi vì một số đột biến ERα phát sinh dưới dạng cơ chế kháng đối với việc điều trị hiện tại. SERD, cụ thể là SERD mà có thể được dùng theo đường miệng ở liều lượng có khả năng lớn hơn mà không quá bất tiện, sau đó có thể được sử dụng một cách có lợi để điều trị cho bệnh nhân có các đột biến ERα mà có thể kháng với các liệu pháp khác. Do đó điều này mang lại cơ hội, phương pháp và công cụ để chọn lọc bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), cụ thể là bệnh nhân ung thư. Sáng chế đề cập đến công cụ và phương pháp chọn lọc bệnh nhân (bao gồm y học cá nhân hóa). Việc lựa chọn này dựa trên việc liệu tế bào khối u cần điều trị có gen ERα kiểu dại hoặc đột biến. Do đó tình trạng gen ERα có thể được sử dụng làm chỉ thị sinh học để chỉ ra rằng việc điều trị chọn lọc bằng SERD có thể có lợi. Để cho rõ ràng, các hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), như được mô tả ở đây, được cho là có hoạt tính tương tự

chống lại gen ERα kiểu dại và đột biến, ít nhất là các đột biến ở gen ERα được xác định vào ngày nộp đơn này.

Có nhu cầu rõ ràng đối với các chỉ thị sinh học mà sẽ làm giàu đối với hoặc chọn lọc bệnh nhân mà khối u của họ sẽ đáp ứng với điều trị bằng SERD, chẳng hạn như hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID). Chỉ thị sinh học chọn lọc bệnh nhân mà nhận diện bệnh nhân có khả năng nhất để đáp ứng với một chất này hơn là chất khác là lý tưởng trong điều trị bệnh ung thư, vì chúng làm giảm việc điều trị không cần thiết của bệnh nhân có khối u không đáp ứng đối với các tác dụng phụ tiềm tàng của chất này.

Chỉ thị sinh học có thể được mô tả dưới dạng "đặc điểm mà được đo và đánh giá khách quan dưới dạng chất chỉ thị của quy trình sinh học bình thường, quy trình gây bệnh, hoặc đáp ứng dược lý với sự can thiệp trị liệu". Chỉ thị sinh học là chất chỉ thị có thể nhận diện và đo được bất kỳ đi kèm theo tình trạng bệnh hoặc bệnh cụ thể trong đó có sự tương quan giữa sự có mặt hoặc hàm lượng của chỉ thị sinh học và một số khía cạnh của tình trạng bệnh hoặc bệnh (bao gồm sự có mặt, hàm lượng hoặc hàm lượng thay đổi, loại, giai đoạn, tính nhạy cảm đối với tình trạng bệnh hoặc bệnh, hoặc sự đáp ứng với thuốc được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh hoặc bệnh). Sự tương quan có thể là định tính, định lượng, hoặc cả định tính và định lượng. Thông thường chỉ thị sinh học là hợp chất, mảnh hợp chất hoặc nhóm của hợp chất. Hợp chất này có thể là hợp chất bất kỳ tìm thấy trong hoặc sản xuất bởi sinh vật, bao gồm protein (và peptit), axit nucleic và hợp chất khác.

Chỉ thị sinh học có thể có khả năng dự đoán, và như vậy có thể được sử dụng để dự đoán hoặc phát hiện sự có mặt, hàm lượng, loại hoặc giai đoạn của tình trạng bệnh và bệnh cụ thể (bao gồm sự có mặt hoặc hàm lượng của vi sinh vật hoặc độc tố cụ thể), tính nhạy cảm (bao gồm tính nhạy cảm di truyền) đối với tình trạng bệnh và bệnh cụ thể, hoặc đáp ứng với việc điều trị cụ thể (bao gồm việc điều trị bằng thuốc). Người ta cho rằng chỉ thị sinh học sẽ có vai trò ngày càng quan trọng trong tương lai phát hiện và phát triển thuốc, bằng cách cải thiện hiệu quả của chương trình nghiên cứu và phát triển. Chỉ thị sinh học có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán, theo dõi sự tiến triển của bệnh, theo dõi việc điều trị và

dự đoán kết quả lâm sàng. Ví dụ, các dự án nghiên cứu chỉ thị sinh học khác nhau cố gắng để nhận diện chỉ thị của bệnh ung thư cụ thể và của các bệnh tim mạch và miễn dịch đặc hiệu. Tin rằng sự phát triển của chỉ thị sinh học được kiểm chứng mới sẽ đều dẫn đến sự giảm đáng kể ở chi phí chăm sóc sức khỏe và phát triển thuốc và sự cải thiện đáng kể ở việc điều trị đối với nhiều loạn bệnh và tình trạng bệnh.

Để thiết kế tối ưu thử nghiệm lâm sàng và để có được thông tin tốt nhất từ các thử nghiệm này, chỉ thị sinh học có thể cần thiết. Chỉ thị có thể đo được ở mô khối u và mô thay thế. Lý tưởng là các chỉ thị này cũng sẽ tương quan với hiệu quả và do đó cuối cùng có thể được sử dụng để chọn lọc bệnh nhân.

Do đó, vấn đề kỹ thuật bên dưới khía cạnh này của sáng chế là việc xác định phương tiện để phân tầng bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất có công thức (I). Vấn đề kỹ thuật này được giải quyết bằng các phương án nêu trong yêu cầu bảo hộ và/hoặc phần mô tả của sáng chế.

Khối u mà chứa ERα kiểu dại được tin là nhạy cảm với việc điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), ví dụ như việc điều trị tuyến đầu. Khối u cũng có thể đáp ứng với việc điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) dưới dạng trị liệu tuyến thứ hai, tuyến thứ ba hoặc tuyến tiếp theo và nó có thể hữu dụng, cụ thể là, trong đó khối u chứa ERα đột biến và do đó có thể kháng với các liệu pháp hiện tại chẳng hạn như AI. Liều lượng cao hơn của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) có thể cần thiết trong trường hợp kháng so với khối u kiểu dại).

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định tính nhạy cảm của tế bào đối với hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID). Phương pháp này bao gồm bước xác định tình trạng của gen ERα trong tế bào đó. Tế bào được xác định là nhạy với hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) nếu nó ức chế sự tăng lên của số lượng tế bào trong thử nghiệm sinh trưởng tế bào (thông qua sự ức chế của sự tăng sinh tế bào và /hoặc thông qua sự chết tế bào tăng lên). Phương pháp theo sáng chế hữu dụng để dự đoán rằng tế bào có khả năng hơn để đáp ứng với hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) bằng cách ức chế sinh trưởng.

Mẫu "đại diện của khối u" có thể là mẫu khối u thực sự được phân lập, hoặc có thể mẫu mà đã được xử lý thêm, ví dụ mẫu của axit nucleic được khuếch đại bằng PCR từ mẫu khối u.

Định nghĩa:

Trong phần chăm sóc sức khỏe cá nhân hóa này:

"Alen" dùng để chỉ dạng cụ thể của locut di truyền, phân biệt với các dạng khác bởi trình tự nucleotit hoặc axit amin của nó.

"Phản ứng khuếch đại" là phản ứng axit nucleic mà dẫn đến sự khuếch đại đặc hiệu của axit nucleic đích để lại axit nucleic không phải đích. Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) là phản ứng khuếch đại đã được biết rõ.

"Bệnh ung thư" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ sự sinh trưởng khối u phát sinh từ sự biến đổi tế bào thành kiểu hình khối u. Sự biến đổi tế bào này thường bao gồm đột biến di truyền.

"Gen" là đoạn ADN mà chứa tất cả thông tin để sinh tổng hợp có điều hòa sản phẩm ARN, bao gồm vùng khởi động, exon, intron, và các thành phần trình tự khác mà có thể nằm ở trong các vùng củng cố bên lề 5' hoặc 3' (không ở trong phần được phiên mã của gen) mà kiểm soát sự biểu hiện.

"Tình trạng gen" dùng để chỉ việc gen là kiểu dại hay không (tức là đột biến).

"Nhãn" dùng để chỉ hợp phần có khả năng tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được chỉ ra sự có mặt của polynucleotit đích trong mẫu thử nghiệm. Nhãn thích hợp bao gồm đồng vị phóng xạ, nhóm mang màu nucleotit, enzym, cơ chất, phân tử huỳnh quang, gốc phát quang hóa học, hạt từ tính, gốc phát quang sinh học, và dạng tương tự. Như vậy, nhãn là hợp phần bất kỳ có thể phát hiện được bằng phương tiện quang phổ, quang hóa, hóa sinh, hóa miễn dịch, điện, quang hoặc hóa học.

"Biến dị không đồng nghĩa" dùng để chỉ biến dị (biến đổi) ở trong hoặc gối lên trình tự mã hóa của gen mà dẫn đến sự sản xuất ra trình tự polypeptit khác biệt (được thay đổi). Sự biến đổi này có thể ảnh hưởng hoặc không ảnh hưởng đến chức năng protein và bao gồm các biến thể sai nghĩa (dẫn đến sự thế của một axit amin bằng axit amin khác), biến thể vô nghĩa (dẫn đến polypeptit bị cắt cụt do sự

tạo ra bộ ba kết thúc sớm) và biến thể cài xen/làm khuyết.

"Biến dị đồng nghĩa" dùng để chỉ biến dị (biến đổi) trong trình tự mã hóa của gen mà không ảnh hưởng đến trình tự của polypeptit được mã hóa. Các biến đổi này có thể ảnh hưởng đến chức năng protein một cách gián tiếp (ví dụ bằng cách làm thay đổi sự biểu hiện của gen), nhưng, không có bằng chứng về điều ngược lại, thường được giả định là vô thưởng vô phạt.

"Axit nucleic" dùng để chỉ phân tử ADN và ARN sợi đơn hoặc sợi kép bao gồm axit nucleic tự nhiên tìm thấy trong tự nhiên và/hoặc được cải biến, axit nucleic nhân tạo có khung hoặc bazơ được cải biến, như đã biết trong lĩnh vực.

"Đoạn mồi" dùng để chỉ trình tự oligonucleotit ADN sợi đơn có khả năng tác động như là điểm bắt đầu để tổng hợp sản phẩm kéo dài đoạn mồi mà bổ sung với sợi axit nucleic cần sao chép. Chiều dài và trình tự của đoạn mồi phải phù hợp sao cho chúng có thể làm mồi cho sự tổng hợp của sản phẩm kéo dài. Đoạn mồi điển hình có chiều dài chứa ít nhất là khoảng 7 nucleotit của trình tự về cơ bản bổ sung với trình tự đích, nhưng đoạn mồi dài hơn một chút được ưu tiên. Thông thường đoạn mồi chứa khoảng 15-26 nucleotit, nhưng đoạn mồi dài hơn hoặc ngắn hơn cũng có thể được sử dụng.

"Vị trí đa hình" là vị trí ở trong locut mà ít nhất là hai trình tự thay thế được tìm thấy ở đó trong quần thể.

"Hiện tượng đa hình" dùng để chỉ sự biến đổi trình tự quan sát được ở cá thể ở vị trí đa hình. Hiện tượng đa hình bao gồm sự thế, sự cài xen, sự làm khuyết và vi vệ tinh nucleotit và có thể, nhưng không cần thiết, dẫn đến sự khác biệt có thể phát hiện được ở sự biểu hiện gen hoặc chức năng protein. Khi không có bằng chứng về ảnh hưởng lên sự biểu hiện hoặc chức năng protein, hiện tượng đa hình phổ biến, bao gồm biến thể không đồng nghĩa, thường được coi là được bao gồm trong định nghĩa về trình tự gen kiểu dại. Danh mục hiện tượng đa hình ở người và chú thích đi kèm, bao gồm kiểm chứng, tần suất quan sát được, và sự kết hợp bệnh, được duy trì bởi NCBI (dbSNP: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/). Lưu ý rằng thuật ngữ "hiện tượng đa hình" khi được sử dụng trong ngữ cảnh của trình tự gen không được nhầm lẫn với thuật ngữ "hiện tượng đa hình" khi được sử dụng trong ngữ cảnh của dạng trạng

thái rắn của hợp chất, mà có bản chất kết tinh hoặc vô định hình của hợp chất. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu được nghĩa được dự định theo ngữ cảnh.

"Đoạn dò" dùng để chỉ oligonucleotit đặc hiệu trình tự sợi đơn mà có trình tự bổ sung chính xác với trình tự đích của alen cần được phát hiện.

"Đáp ứng" được xác định bằng phép đo được thực hiện theo Tiêu Chuẩn Đánh Giá Đáp Ứng Ở Khối U Rắn (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours - RECIST) bao gồm việc phân loại bệnh nhân vào hai nhóm chính: các bệnh nhân thể hiện đáp ứng một phần hoặc bệnh ổn định và bệnh nhân thể hiện dấu hiệu của bệnh tiến triển.

"Điều kiện lai hóa nghiêm ngặt" dùng để chỉ việc ủ qua đêm ở nhiệt độ 42°C trong dung dịch có chứa 50% formamit, 5x SSC (750 mM NaCI, 75 mM trinatri xitrat), 50 mM natri phosphat (độ pH 7,6), 5x dung dịch Denhardt, 10% đextran sulphat, và 20 pg/mI ADN tinh trùng cá hồi đã được cắt, được biến tính, sau đó rửa bộ lọc trong 0,lx SSC ở khoảng 65°C.

"Sự sống sót" bao hàm sự sống sót nói chung của bệnh nhân và sự sống sót không tiến triển.

"Sự sống sót nói chung" (OS) được định nghĩa là thời gian từ khi bắt đầu dùng thuốc đến khi tử vong do nguyên nhân bất kỳ. "Sự sống sót không tiến triển" (PFS) được định nghĩa là thời gian từ khi bắt đầu dùng thuốc đến khi xuất hiện lần đầu tiên bệnh tiến triển hoặc tử vong do nguyên nhân bất kỳ.

Theo một khía cạnh của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), phương pháp này bao gồm bước cung cấp mẫu chứa tế bào khối u từ bệnh nhân; xác định liệu gen ERα trong mẫu chứa tế bào khối u của bệnh nhân là kiểu dại hay đột biến; và chọn lọc bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) dựa trên đó.

Phương pháp này có thể bao gồm hoặc không bao gồm bước phân lập mẫu bệnh nhân thực sự. Do đó, theo một khía cạnh của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), phương pháp này có chứa bước xác định liệu gen ERα trong

mẫu chứa tế bào khối u được phân lập từ trước từ bệnh nhân là kiểu dại hay đột biến; và chọn lọc bệnh nhân để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID) dựa trên đó.

Theo một phương án, bệnh nhân được chọn để điều trị bằng hợp chất có công thức (I) nếu ADN tế bào khối u có gen ERα đột biến. Theo các phương án khác, bệnh nhân mà ADN tế bào khối u của họ mang gen ERα kiểu dại được chọn để điều trị bằng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID).

Để đạt được mục đích của sáng chế, tình trạng gen kiểu dại có nghĩa là dùng để chỉ ra sự biểu hiện bình thường hoặc phù hợp của gen và chức năng bình thường của protein được mã hóa. Ngược lại, tình trạng đột biến có nghĩa là dùng để chỉ sự biểu hiện của protein với chức năng thay đổi, thống nhất với vai trò đã biết của gen ERα đột biến ở bệnh ung thư (như được mô tả trong bản mô tả này). Số lượng bất kỳ của các thay đổi di truyền hoặc biểu sinh, bao gồm nhưng không giới hạn ở đột biến, khuếch đại, làm khuyết, tái sắp xếp hệ gen, hoặc sự thay đổi ở biên dạng metyl hóa, có thể dẫn đến tình trạng đột biến. Tuy nhiên, nếu sự thay đổi này tuy vậy dẫn đến sự biểu hiện phù hợp của protein bình thường, hoặc biến thể có chức năng tương đương, thì tình trạng gen được coi là kiểu dại. Ví dụ về các biến thể mà thường không dẫn đến tình trạng gen đột biến chức năng bao gồm biến thể mã hóa đồng nghĩa và hiện tượng đa hình phổ biến (đồng nghĩa hoặc không đồng nghĩa). Như thảo luận dưới đây, tình trạng gen có thể được đánh giá bằng thử nghiệm chức năng, hoặc nó có thể được suy ra từ bản chất của sự sai lệch được phát hiện từ trình tự tham chiếu.

Theo phương án nhất định tình trạng kiểu dại hoặc đột biến của gen ERα được xác định bằng sự có mặt hoặc vắng mặt của sự biến đổi axit nucleic không đồng nghĩa trong gen. Sự biến đổi không đồng nghĩa quan sát được tương ứng với hiện tượng đa hình phổ biến đã biết không có tác dụng chức năng được chỉ ra không góp phần vào tình trạng gen của đột biến.

Các thay đổi khác trong gen ERα mà biểu thị tình trạng đột biến bao gồm sự thay đổi vị trí ghép nối mà làm giảm sự nhận diện của chỗ nối intron/exon trong quá trình xử lý tiền mARN thành mARN. Điều này có thể dẫn đến sự bỏ qua exon hoặc sự bao gồm của trình tự intron bình thường trong mARN được

ghép nối (giữ lại intron hoặc sử dụng mối ghép nối bí ẩn). Đến lượt nó, điều này có thể dẫn đến việc sản xuất protein bất thường có sự cài xen và/hoặc sự làm khuyết so với protein bình thường. Do đó, theo các phương án khác, gen có tình trạng đột biến nếu có biến thể mà làm thay đổi trình tự nhận diện vị trí ghép nối ở chỗ nối intron/exon.

Đối với ESR1, các trình tự tham chiếu có sẵn đối với gen (Mã số truy cập GenBank: NG_008493), mARN (Mã số truy cập GenBank: NM_000125), và protein (Mã số truy cập GenBank: NP_000116 hoặc Truy cập Swiss-Prot: P03372). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định tình trạng gen ESR1, tức là liệu gen ESR1 cụ thể là kiểu dại hay đột biến, dựa trên sự so sánh của trình tự ADN hoặc protein với kiểu dại.

Rõ ràng là các trình tự gen và mARN được bộc lộ đối với gen ERα là các trình tự đại diện. Ở các cá thể bình thường có hai bản sao của mỗi gen, bản sao của bố và của mẹ, mà dường như có một số sự khác biệt trình tự, hơn nữa ở trong quần thể sẽ có tồn tại một số biến thể alen của trình tự gen này. Các trình tự khác được coi như là kiểu dại bao gồm các trình tự mà có một hoặc nhiều sự thay đổi đồng nghĩa đối với trình tự axit nucleic (mà sự thay đổi này không làm thay đổi trình tự protein được mã hóa), hiện tượng đa hình phổ biến không đồng nghĩa (ví dụ hiện tượng đa hình dòng mầm) mà làm thay đổi trình tự protein nhưng không ảnh hưởng đến chức năng protein, và sự thay đổi trình tự ở vị trí không ghép nối intron.

Có nhiều kỹ thuật có sẵn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để xác định tình trạng gen của ERα. Tình trạng gen có thể được xác định bằng cách xác định trình tự axit nucleic. Điều này có thể là thông qua việc xác định trình tự trực tiếp của gen chiều dài đầy đủ hoặc phân tích các vị trí đặc hiệu ở trong gen, ví dụ các vị trí đột biến thông thường.

Mẫu

Mẫu của bệnh nhân cần được thử nghiệm về tình trạng gen có thể là mẫu mô khối u hoặc tế bào khối u bất kỳ thu được hoặc có thể thu được từ cá thể. Mẫu thử nghiệm thuận lợi là mẫu máu, mẫu gạc miệng, mẫu sinh thiết, hoặc mẫu dịch hoặc mô cơ thể khác thu được từ cá thể. Các ví dụ cụ thể bao gồm: tế bào khối u

tuần hoàn, ADN tuần hoàn trong huyết tương hoặc huyết thanh, tế bào được phân lập từ dịch báng của bệnh nhân ung thư buồng trứng, đờm phổi đối với bệnh nhân có khối u ở trong phổi, kim nhỏ hút ra từ bệnh nhân ung thư vú, nước tiểu, máu ngoại vi, nạo tế bào, nang lông, miếng đột da hoặc mẫu má.

Hiểu rõ rằng mẫu thử nghiệm có thể đều là trình tự axit nucleic tương ứng với trình tự trong mẫu thử nghiệm, mà có thể nói rằng tất cả hoặc một phần của vùng trong axit nucleic mẫu có thể trước hết được khuếch đại bằng cách sử dụng kỹ thuật thuận tiện bất kỳ ví dụ phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), trước khi phân tích. Axit nucleic có thể là ADN hệ gen hoặc ARN tế bào được phân đoạn hoặc toàn bộ ARN tế bào. Theo các phương án cụ thể ARN là toàn bộ ARN tế bào và được sử dụng trực tiếp làm khuôn để gắn nhãn cADN sợi thứ nhất bằng cách sử dụng đoạn mồi ngẫu nhiên hoặc đoạn mồi poly A. Axit nucleic hoặc protein trong mẫu thử nghiệm có thể được chiết từ mẫu theo phương pháp tiêu chuẩn (xem tài liệu Green & Sambrook, Eds.,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)

Phương pháp chẩn đoán theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu được lấy từ trước từ cá thể hoặc bệnh nhân. Các mẫu này có thể được bảo quản bằng cách làm đông lạnh hoặc được cố định và được nhúng trong formalin-parafin hoặc môi trường khác. Theo cách khác, mẫu mới chứa tế bào khối u có thể được thu lấy và được sử dụng.

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng bằng cách sử dụng tế bào từ khối u bất kỳ. Khối u thích hợp để điều trị bằng hợp chất có công thức (I) đã được mô tả ở trên.

Phương pháp phát hiện axit nucleic

Việc phát hiện axit nucleic ERα đột biến có thể được sử dụng, trong ngữ cảnh theo sáng chế, để chọn việc điều trị bằng thuốc. Vì đột biến trong các gen này xảy ra ở cấp độ ADN, phương pháp theo sáng chế có thể dựa trên sự phát hiện của đột biến hoặc sự biến đổi ở ADN hệ gen, cũng như là bản thân bản phiên mã và protein. Điều mong muốn là xác nhận đột biến trong ADN hệ gen bằng cách phân tích bản phiên mã và/hoặc polypeptit, để đảm bảo rằng đột biến được phát

hiện thật sự được biểu hiện ở đối tượng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng có số lượng lớn các quy trình phân tích mà có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của nucleotit biến đổi ở một hoặc nhiều vị trí trong gen. Nhìn chung, việc phát hiện biến đổi alen cần kỹ thuật phân biệt đột biến, tùy ý phản ứng khuếch đại (chẳng hạn như phản ứng khuếch đại dựa trên phản ứng chuỗi polymeraza) và tùy ý hệ thống tạo tín hiệu. Có vô số kỹ thuật phát hiện đột biến có sẵn trong lĩnh vực và các kỹ thuật này có thể được sử dụng kết hợp với hệ thống tạo tín hiệu, mà có nhiều hệ thống này có sẵn trong lĩnh vực. Nhiều phương pháp phát hiện biến đổi alen đã được bàn luận bởi Nollau et al., Clin. Chem., 1997, 43, 1114-1120; Anderson SM. Expert Rev Mol Diagn., 2011, 11, 635-642; Meyerson M. et al., Nat Rev Genet., 2010, 11, 685-696; và trong các tài liệu tiêu chuẩn, ví dụ như "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996 and "PCR", 2nd Edition by Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

Như lưu ý ở trên, việc xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của sự biến đổi cụ thể hoặc nhiều sự biến đổi trong gen ERα ở bệnh nhân mắc ung thư có thể được thực hiện theo nhiều cách. Các thử nghiệm này thường được thực hiện bằng cách sử dụng ADN hoặc ARN thu gom từ mẫu sinh học, ví dụ, mảnh sinh thiết mô, nước tiểu, phân, đờm, máu, tế bào, nạo mô, chọc hút vú hoặc các nguyên liệu tế bào khác, và có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, PCR, lai hóa với đoạn dò đặc hiệu alen, phát hiện đột biến enzym, phân cắt hóa học chỗ bắt cặp nhầm, đo phổ khối hoặc xác định trình tự ADN, bao gồm xác định trình tự nhỏ.

Kỹ thuật phát hiện đột biến thích hợp bao gồm các kỹ thuật hệ thống gây đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ARMS™), sự kéo dài tuyến tính hệ thống gây đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ALEX™), hệ thống mồi oligonucleotit cạnh tranh (COPS), Taqman, Beacons Phân tử, hiện tượng đa hình chiều dài mảnh giới hạn (RFLP), và PCR dựa trên vị trí giới hạn và chuyển giao năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET).

Theo các phương án cụ thể phương pháp dùng để xác định (các) nucleotit ở

trong chỉ thị sinh học gen được chọn từ: sự khuếch đại đặc hiệu alen (PCR đặc hiệu alen) – chẳng hạn như hệ thống gây đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ARMS), xác định trình tự, thử nghiệm phân biệt alen, lai hóa, hiện tượng đa hình chiều dài mảnh giới hạn (RFLP) hoặc thử nghiệm nối oligonucleotit (OLA).

Theo các phương án cụ thể, sự lai hóa với đoạn dò đặc hiệu alen có thể được thực hiện bằng cách: (1) oligonucleotit đặc hiệu alen liên kết với pha rắn (ví dụ như thủy tinh, silic, màng ni lông) với mẫu đã được gắn nhãn trong dung dịch, ví dụ như trong nhiều ứng dụng chip ADN; hoặc, (2) mẫu đã được liên kết (thường là ADN được tách dòng hoặc ADN được khuếch đại bằng PCR) và oligonucleotit đã được gắn nhãn trong dung dịch (đặc hiệu alen hoặc ngắn để cho phép xác định trình tự bằng cách lai hóa). Thử nghiệm chẩn đoán có thể gồm có bảng của các biến đổi, thường là trên giá đỡ rắn, mà giúp cho có thể xác định đồng thời hơn một sự biến đổi. Các đoạn dò lai hóa này đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem, ví dụ như, Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) và có thể mở rộng qua hai hoặc hơn hai vị trí biến đổi.

Do đó, theo một phương án, việc xác định sự có mặt hoặc không có mặt của ít nhất là một đột biến mang lại sự tiếp xúc axit nucleic ERα chứa vị trí đột biến giả định với ít nhất là một đoạn dò axit nucleic. Đoạn dò này ưu tiên lai hóa với trình tự axit nucleic bao gồm vị trí biến đổi và chứa các bazơ nucleotit bổ sung tại vị trí biến đổi trong điều kiện lai hóa chọn lọc. Sự lai hóa có thể được phát hiện bằng nhãn có thể phát hiện được bằng cách sử dụng các nhãn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực trong lĩnh vực. Các nhãn này bao gồm, nhưng không giới hạn ở các nhãn có hoạt tính phóng xạ, huỳnh quang, thuốc nhuộm và enzym.

Theo phương án khác, việc xác định sự có mặt hoặc không có mặt của ít nhất là một đột biến mang lại sự tiếp xúc axit nucleic ERα chứa vị trí đột biến giả định với ít nhất là một đoạn mồi axit nucleic. Đoạn mồi này ưu tiên lai hóa với trình tự axit nucleic bao gồm vị trí biến đổi và chứa các bazơ nucleotit bổ sung tại vị trí biến đổi trong điều kiện lai hóa chọn lọc.

Oligonucleotit được sử dụng làm đoạn mồi để khuếch đại đặc hiệu có thể mang bazơ nucleotit bổ sung với đột biến được quan tâm ở trung tâm của phân tử (do đó sự khuếch đại phụ thuộc vào sự lai hóa khác nhau; xem, ví dụ như, Gibbs, et al., 1989. Nucl. Acids Res., 17, 2437-248) hoặc ở đầu 3' ngoài cùng của một đoạn mồi trong đó, trong điều kiện thích hợp, sự bắt cặp nhầm có thể ngăn ngừa, hoặc làm giảm sự kéo dài polymeraza (xem, ví dụ như, Prossner, 1993, Tibtech, 11 238).

Theo phương án khác nữa, việc phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của ít nhất là một đột biến có chứa việc xác định trình tự của ít nhất là một trình tự axit nucleic và so sánh trình tự thu được với trình tự axit nucleic kiểu dại đã biết.

Theo cách khác, sự có mặt hoặc không có mặt của ít nhất là một đột biến có chứa sự xác định phổ khối của ít nhất là một trình tự axit nucleic.

Theo một phương án, việc phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của ít nhất là một biến đổi axit nucleic có chứa việc thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR). Trình tự axit nucleic đích chứa biến đổi giả định được khuếch đại và trình tự nucleotit của axit nucleic đã được khuếch đại được xác định. Việc xác định trình tự nucleotit của axit nucleic đã được khuếch đại có chứa việc xác định trình tự ít nhất là một đoạn axit nucleic. Theo cách khác, sản phẩm khuếch đại có thể được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ có khả năng tách sản phẩm khuếch đại theo kích thước của chúng, bao gồm sắc ký trên gel tự động và bằng tay, và phương pháp tương tự.

Các đột biến ở axit nucleic hệ gen được phát hiện thuận lợi bằng các kỹ thuật dựa trên sự dịch chuyển di động ở các mảnh axit nucleic đã được khuếch đại. Ví dụ như, Chen et al., Anal Biochem 1996, 239, 61-9, mô tả sự phát hiện các đột biến bazơ đơn lẻ bằng thử nghiệm dịch chuyển di động cạnh tranh. Ngoài ra, thử nghiệm dựa trên trên kỹ thuật của Marcelino et al., BioTechniques 1999, 26, 1134-1148 có sẵn trên thị trường.

Trong ví dụ cụ thể, phân tích dị sợi kép mao quản có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các đột biến dựa trên sự dịch chuyển di động của axit nucleic sợi kép trong hệ thống mao quản là kết quả của sự có mặt của sự bắt cặp nhầm.

Tạo ra axit nucleic để phân tích từ mẫu thường cần khuếch đại axit nucleic. Nhiều phương pháp khuếch đại dựa trên phản ứng chuỗi enzym (chẳng hạn như phản ứng chuỗi polymeraza, phản ứng chuỗi ligaza, hoặc sao chép trình tự tự duy trì) hoặc từ sự sao chép của tất cả hoặc một phần của vật truyền mà nó đã được tách dòng vào. Tốt hơn là, khuếch đại theo sáng chế là khuếch đại theo hàm mũ, như được thể hiện ví dụ bằng phản ứng chuỗi polymeraza.

Nhiều phương pháp khuếch đại đích và tín hiệu đã được mô tả trong tài liệu, ví dụ, tổng quan về các phương pháp này trong Landegren, U., et al., Science, 1988 242, 229-237 và Lewis, R., Genetic Engineering News 1990, 10, 54-55. Các phương pháp khuếch đại này có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, và bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), PCR in situ, phản ứng khuếch đại ligaza (LAR), lai hóa ligaza, Qβ replicaza thể thực khuẩn, hệ thống khuếch đại dựa trên sự phiên mã (TAS), khuếch đại hệ gen với xác định trình tự bản phiên mã (GAWTS), khuếch đại dựa trên trình tự axit nucleic (NASBA) và lai hóa in situ. Đoạn mồi thích hợp để sử dụng trong các kỹ thuật khuếch đại khác nhau có thể được điều chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) PCR là phương pháp khuếch đại axit nucleic được mô tả không kể những thứ khác trong Bằng Sáng Chế Mỹ số 4,683,195 và 4,683,202. PCR gồm có các chu kỳ lặp lại của phản ứng kéo dài đoạn mồi được tạo ra bằng ADN polymeraza. ADN đích được làm biến tính nhiệt và hai oligonucleotit, mà bao quanh trình tự đích trên các sợi đối ngược của ADN cần được khuếch đại, được lai hóa. Các oligonucleotit này trở thành đoạn mồi để sử dụng với ADN polymeraza. ADN này được sao chép bằng cách kéo dài đoạn mồi để tạo ra bản sao thứ hai của cả hai sợi. Bằng cách lặp lại chu kỳ biến tính nhiệt, lai hóa và kéo dài đoạn mồi, ADN đích có thể được khuếch đại hàng triệu lần hoặc nhiều hơn trong khoảng từ hai đến bốn giờ. PCR là công cụ sinh học phân tử, mà phải được sử dụng kết hợp với kỹ thuật phát hiện để xác định kết quả của sự khuếch đại. Ưu điểm của PCR là nó làm tăng tính nhạy cảm bằng cách khuếch đại lượng ADN đích lên từ 1 triệu đến 1 tỉ lần trong xấp xỉ 4 giờ. PCR có thể được sử dụng để khuếch đại axit nucleic đã biết bất kỳ trong trường hợp chẩn

đoán (Mok et al., Gynaecologic Oncology, 1994, 52: 247-252,).

Kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen chẳng hạn như Hệ thống Gây đột biến Chịu nhiệt Khuếch đại (ARMS™) (Newton et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 2503-2516) cũng có thể được sử dụng để phát hiện đột biến bazơ đơn lẻ. Trong điều kiện khuếch đại PCR thích hợp sự bắt cặp nhầm bazơ đơn lẻ nằm ở đầu 3' của đoạn mồi là đủ để khuếch đại ưu tiên alen được bắt cặp hoàn hảo (Newton et al., 1989, *supra*), cho phép phân biệt các loài có quan hệ gần gũi. Cơ sở của hệ thống khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi được mô tả ở trên là oligonucleotit với gốc 3' bắt cặp nhầm sẽ không đóng vai trò làm đoạn mồi trong PCR trong điều kiện thích hợp. Hệ thống khuếch đại này cho phép tạo kiểu gen chỉ bằng cách kiểm tra hỗn hợp phản ứng sau khi điện di trên gel agaroza.

Phân tích sản phẩm khuếch đại có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ có khả năng tách sản phẩm khuếch đại theo kích thước của chúng, bao gồm sắc ký trên gel tự động và bằng tay, đo phổ khối, và phương pháp tương tự.

Phương pháp phân lập, khuếch đại và phân tích axit nucleic là quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và ví dụ về các quy trình này có thể tìm thấy trong, ví dụ, Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) Nguồn quy trình đặc biệt hữu dụng cho phương pháp được sử dụng trong khuếch đại PCR là PCR (Basics: From Background to Bench) by M. J. McPherson, S. G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 1st edition (October 15, 2000), ISBN: 0387916008.

Sáng chế này cũng đề xuất bộ kit dự đoán và chẩn đoán có chứa đoạn mồi thoái hóa để khuếch đại axit nucleic đích trong gen ERα và hướng dẫn sử dụng có chứa; quy trình khuếch đại và phân tích kết quả. Bộ kit theo cách khác có thể còn có chứa chất đệm, enzym, và vật chứa để thực hiện sự khuếch đại và phân tích sản phẩm khuếch đại. Bộ kit cũng có thể là thành phần của bộ kit sàng lọc, hoặc chẩn đoán có chứa các công cụ khác chẳng hạn như microarray ADN, hoặc các giá đỡ khác. Tốt hơn là, bộ kit còn cung cấp một hoặc nhiều khuôn đối chứng, chẳng hạn

như axit nucleic được phân lập từ mẫu mô bình thường, và/hoặc loạt mẫu thể hiện các biến đổi khác nhau trong gen tham chiếu.

Theo một phương án, bộ kit cung cấp hai hoặc hơn hai cặp đoạn mồi, mỗi cặp có khả năng khuếch đại vùng khác nhau của gen (ERα) tham chiếu (mỗi vùng vị trí biến đổi tiềm năng) bằng cách đó cung cấp bộ kit để phân tích sự biểu hiện của một vài biến đổi gen trong mẫu sinh học trong một phản ứng hoặc một vài phản ứng song song.

Đoạn mồi trong bộ kit có thể được gắn nhãn, ví dụ như được gắn nhãn huỳnh quang, để làm thuận lợi cho sự phát hiện của sản phẩm khuếch đại và phân tích biến đổi axit nucleic sau đó. Bộ kit cũng có thể cho phép phát hiện hơn một biến đổi trong một phân tích. Do đó bộ kit kết hợp có chứa đoạn mồi có khả năng khuếch đại các đoạn khác nhau của gen tham chiếu. Các đoạn mồi có thể được gắn nhãn khác nhau, ví dụ như bằng cách sử dụng các nhãn huỳnh quang khác nhau, do đó phân biệt được các biến đổi.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh ung thư có chứa các bước: xác định tình trạng đột biến hoặc kiểu dại của gen ERα trong tế bào khối u của bệnh nhân và nếu gen ERα bị đột biến, cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "hữu hiệu" và "độ hữu hiệu" bao gồm cả độ hữu hiệu dược học và độ an toàn sinh lý. Độ hữu hiệu dược học dùng để chỉ khả năng của việc điều trị để dẫn đến hiệu quả sinh học mong muốn ở bệnh nhân. Độ an toàn sinh lý dùng để chỉ mức độ gây độc, hoặc các hiệu quả sinh lý có hại khác ở cấp độ tế bào, cơ quan và/hoặc sinh vật (thường được gọi là tác dụng phụ) bắt nguồn từ việc áp dụng điều trị. "Ít hữu hiệu" có nghĩa là việc điều trị dẫn đến mức độ thấp hơn đáng kể để trị liệu của độ hữu hiệu dược học và/hoặc mức độ lớn hơn đáng kể để trị liệu của hiệu quả sinh lý có hại.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID),hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị bệnh nhân ung thư mà tế bào khối u của nọ đã được xác định là mang gen ERα đột biến.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID),hoặc muối dược dụng của chúng để điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u được xác định là ẩn chứa gen ERα đột biến.

Theo khía cạnh khác của sáng chế sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u được xác định là ẩn chứa gen ERα đột biến bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID),hoặc muối dược dụng của chúng.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm có chứa hợp chất có công thức (I), (IA), (IB), (IC) hoặc (ID), để sử dụng trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u được xác định là ẩn chứa gen ERα đột biến.

Đối với tất cả các khía cạnh ở trên, dạng đột biến của ERα được xác định/được nhận dạng là ở tất cả các vị trí trong toàn bộ gen.

Đối với tất cả các khía cạnh ở trên, bằng cách sử dụng khối u chẳng hạn như bệnh ung thư vú làm ví dụ, các dạng đột biến cụ thể của ERα được xác định/được nhận ra là các đột biến ở các vị trí Ser463Pro, Val543Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn và Asp538Gly.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các hợp chất được mô tả trong bản mô tả này được minh họa thêm trong các ví dụ sau đây. Các ví dụ này được nêu chỉ để minh họa và không làm giới hạn sáng chế. Nhìn chung:

(i) các hoạt động được thực hiện ở nhiệt độ môi trường xung quanh, *tức là* trong khoảng từ 17 đến 25°C và dưới khí quyển của khí trơ chẳng hạn như nitơ trừ khi có chỉ dẫn khác;

(ii) sự bay hơi được thực hiện bằng sự bay hơi quay hoặc sử dụng thiết bị Genevac hoặc thiết bị làm bay hơi Biotage v10 trong chân không và các quy trình phụ được thực hiện sau khi loại bỏ chất rắn còn lại bằng cách lọc;

(iii) tinh chế bằng sắc ký nhanh được thực hiện trên Teledyne Isco CombiFlash® Rf tự động hoặc Teledyne Isco CombiFlash® Companion® bằng cách sử dụng Cột Silic Oxit RediSep Rf Gold™ Đóng gói sẵn (20-40 µm, hạt hình

cầu), Hộp chứa GraceResolv™ (silic oxit Davisil®) hoặc Hộp chứa Silicycle (40 - 63 µm).

(iv) sắc ký điều chế được thực hiện trên thiết bị Gilson prep HPLC với tập hợp UV hoặc thông qua sắc ký lỏng siêu tới hạn được thực hiện trên thiết bị Waters Prep 100 SFC-MS với tập hợp được kích hoạt MS và UV hoặc thiết bị Thar MultiGram III SFC với tập hợp UV;

(v) sắc ký điều chế bất đối xứng được thực hiện trên thiết bị Gilson với tập hợp UV (kim phun / bộ thu gom phân đoạn 233, các bơm 333 & 334, bộ phát hiện UV 155) hoặc thiết bị Varian Prep Star (2 x bơm SD1, bộ phát hiện UV 325, bộ thu gom phân đoạn 701) bơm chạy bằng sự phun Gilson 305;

(vi) hiệu suất, khi có mặt, không cần phải có thể đạt được lớn nhất;

(vii) nhìn chung, cấu trúc của sản phẩm cuối có công thức I được xác nhận bằng quang phổ cộng hưởng từ nhân (NMR); giá trị dịch chuyển hóa học NMR được đo trên thang delta [phổ cộng hưởng từ proton được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Bruker Avance 500 (500 MHz) hoặc Bruker Avance 400 (400 MHz)]; các phép đo được thực hiện ở nhiệt độ môi trường xung quanh trừ khi có chỉ dẫn khác; các chữ viết tắt sau đây được sử dụng: s, mức đơn; d, mức đôi; t, mức ba; q, mức bốn; m, mức bội; dd, mức đôi của mức đôi; ddd, mức đôi của mức đôi của mức đôi; dt, mức đôi của mức ba; br, tín hiệu rộng;

(viii) nhìn chung, sản phẩm cuối có công thức I còn được xác định đặc điểm bằng quang phổ khối sau khi sắc ký lỏng (LCMS hoặc UPLC); UPLC được thực hiện bằng cách sử dụng Waters UPLC lắp với khối phổ kế Waters SQ (Nhiệt độ cột 40, UV = 220-300 nm, Phổ Khối = ESI với sự chuyển mạch dương/âm) ở tốc độ dòng chảy bằng 1 ml/phút bằng cách sử dụng hệ dung môi của 97% A + 3% B đến 3% A với 97% B trong 1,50 phút (tổng thời gian chạy với sự làm cân bằng trở lại điều kiện ban đầu v.v. là 1,70 phút), trong đó A = axit formic 0,1% trong nước (đối với hoạt động axit) hoặc amoniac 0,1% trong nước (đối với hoạt động bazơ) B = axetonitril. Để phân tích axit cột được sử dụng là Waters Acquity HSS T3 1,8µm 2,1 x50 mm, để phân tích bazơ cột được sử dụng là Waters Acquity BEH 1,7µm 2,1x50mm; LCMS được thực hiện bằng cách sử dụng Waters Alliance HT (2795) được lắp với khối phổ kế Waters ZQ ESCi và cột

Phenomenex Gemini –NX (50x2,1mm 5µm) ở tốc độ dòng chảy bằng 1,1ml/phút 95%A đến 95%B trong 4 phút có giữ 0,5 phút. Bộ hiệu chỉnh được giữ ở hằng số 5% C (axetonitril:nước 50:50 axit formic 0,1%) hoặc D (axetonitril:nước 50:50 amoni hyđroxit 0,1% (0,88 SG) tùy thuộc vào việc nó là phương pháp axit hay bazơ.

(ix) tinh chế trao đổi ion thường được thực hiện bằng cách sử dụng hộp chứa SCX-2 (Biotage, Silic oxit chức năng hóa axit propylsulfonic. Được sản xuất bằng cách sử dụng silan ba chức. Không có đầu được đậy mũ).

(x) độ tinh khiết hợp chất trung gian được đánh giá bằng sắc ký lớp mỏng, khối phổ, HPLC (sắc ký lỏng hiệu năng cao) và/hoặc phân tích NMR;

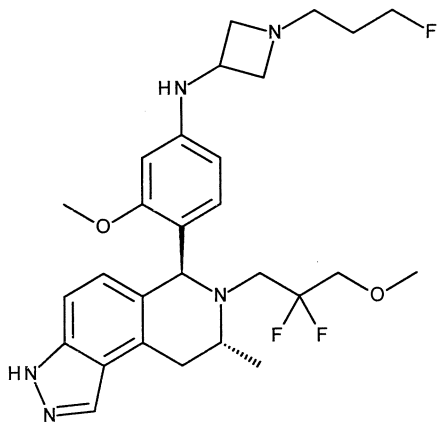
(xi) các chữ viết tắt sau đây được sử dụng:

AcOH	axit axetic
aq.	trong nước
Boc	tert-butoxycarbonyl
n-BuLi	n-butyl lithi
tBuOH	tert-butanol
Brettphos	2-(đixyclohexylphosphino)3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl
$CDCl_3$	đơteri-cloroform
$CHCl_3$	cloroform
Conc.	đặc
DCM	điclometan
DIPEA	điisopropyletylamin
DMAP	đimetylaminopyriđin
DMSO	đimetyl sulphoxit
EtOH	etanol
EtOAc	etyl axetat
HATU	1-[bis(đimetylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyriđinium 3-oxid hexaflophotphat

HCl	axit clohyđric
HPLC	sắc ký lỏng hiệu năng cao
K_2CO_3	kali cacbonat
MeOH	metanol
$MgSO_4$	magie sulfat
NaH	natri hyđrit
$NaHCO_3$	natri bicacbonat
Na_2SO_4	natri sulfat
$Pd_2(dba)_3$	tris(đibenzyliđenaxeton)đipalađi(0)
Rac-BINAP	(±)-2,2′-Bis(điphenylphosphino)-1,1′-binaphtalen
rt/RT	nhiệt độ trong phòng
RockPhos thế hệ thứ 3 tiền chất xúc tác	[(2-đi-tert-butylphosphino-3-metoxy-6-metyl-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2-aminobiphenyl)]palađi(II) metansulfonat
Ruphos	2-đixyclohexylphosphino-2′,6′-điisopropoxy- 1,1′-biphenyl
sat.	bão hòa
SFC	sắc ký lỏng siêu tới hạn
sol.	hòa tan
TBAF	tetra-n-butylamoni florua
TEA	trietylamin
THF	tetrahyđrofuran
THP	tetrahyđropyran
TFA	axit trifloaxetic
Xantphos	4,5-bis(điphenylphosphino)-9,9-đimetyl xanthen

Ví dụ 1

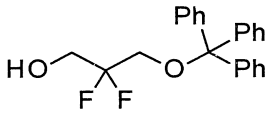
N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′-biphenyl)]palađi(II) metansulfonat (BrettPhos Pd G3) (6,80 mg, 7,50 µmol) vào huyền phù của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (85 mg, 0,15 mmol), 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (29,7 mg, 0,23 mmol) và natri *tert*-butoxit (28,8 mg, 0,30 mmol) trong 1,4-đioxan đã khử khí (1,5 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 90°C trong thời gian 3 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng nước. Chiết lớp nước bằng DCM, sau đó làm khô và làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp. Hòa tan phần cặn thô trong DCM (2 ml) và bổ sung TFA (0,7 ml). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó pha loãng nó bằng DCM và bazơ hóa bằng cách bổ sung dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Các lớp được tách riêng và chiết lớp nước bằng DCM. Làm khô và làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong EtOAc. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (39,0 mg, 49%) dưới dạng chất rắn màu be. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,09 (3H, d), 1,83 (2H, ddd), 2,65 - 2,86 (4H, m), 2,96 - 3,08 (1H, m), 3,11 (1H, dd), 3,22 (2H, d), 3,38 (3H, s), 3,51 - 3,63 (2H, m), 3,73 - 3,82 (1H, m), 3,82 (3H, s), 3,86 (2H, q), 4,15 - 4,28 (1H, m), 4,43 (1H, t), <14636/g>3 (1H, t), 5,37 (1H, s), 5,88 (1H, dd), 6,14 (1H, d), 6,46 (1H, d), 6,80 (1H, d), 7,13 (1H, d), 8,04 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 532.

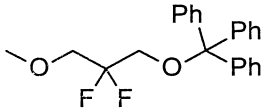
(6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin được điều chế như sau:

Điều chế 2,2-điflo-3-(trityloxy)propan-1-ol



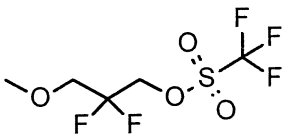
Hòa tan 2,2-điflopropan-1,3-điol (2,50 g, 22,3 mmol) trong DCM (61,7 ml) và THF (15,4 ml). Bổ sung DIPEA (3,93 ml, 22,3 mmol), sau đó là (clometantriyl)tribenzen (6,22 g, 22,3 mmol) và cuối cùng là DMAP (0,288 g, 2,23 mmol). Gia nhiệt phản ứng đến 40°C trong thời gian 2 giờ. Sau khi để nguội, rửa phản ứng bằng dung dịch HCl 1N, sau đó làm khô và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 25% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được 2,2-điflo-3-(trityloxy)propan-1-ol (4,43 g, 56%) dưới dạng chất rắn không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 3,42 (2H, t), 3,92 (2H, t), 7,23 - 7,3 (4H, m), 7,3 - 7,39 (6H, m), 7,39 - 7,49 (6H, m).

Điều chế ((2,2-điflo-3-metoxypropoxy)metantriyl)tribenzen



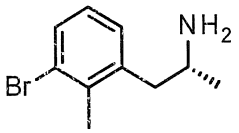
Bổ sung natri hyđrua (0,562 g, 14,0 mmol) vào dung dịch của 2,2-điflo-3-(trityloxy)propan-1-ol (4,15 g, 11,7 mmol) trong THF (46 ml) và khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ, sau đó bổ sung iođometan (0,802 ml, 12,9 mmol) trong THF (5 ml). Khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ nữa. Dập tắt phản ứng bằng nước và nước muối, sau đó chiết bằng EtOAc. Làm khô và làm bay hơi lớp hữu cơ để thu được ((2,2-điflo-3-metoxypropoxy)metantriyl)tribenzen (4,18 g, 97%) dưới dạng dầu màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 3,36 (2H, t), 3,40 (3H, s), 3,77 (2H, t), 7,15 - 7,28 (3H, m), 7,28 - 7,38 (6H, m), 7,39 - 7,47 (6H, m).

Điều chế 2,2-điflo-3-metoxypropyl triflometansulfonat



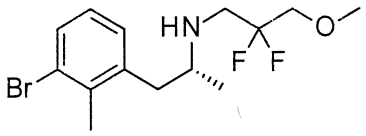
Bổ sung triflometansulfonic anhyđrit (1,918 ml, 11,40 mmol) vào dung dịch của ((2,2-điflo-3-metoxypropoxy)metantriyl)tribenzen (4,00 g, 10,9 mmol) trong DCM (39,6 ml). Khuấy phản ứng trong thời gian 30 phút, sau đó bổ sung trietylsilan (1,934 ml, 11,94 mmol) và khuấy phản ứng trong thời gian 30 phút nữa. Làm bay hơi phản ứng, và triflat, được sử dụng một cách trực tiếp trong giai đoạn tiếp theo.

Điều chế (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-amin



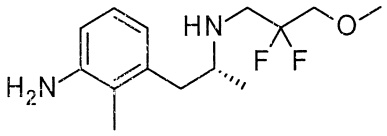
Bổ sung từng giọt n-BuLi (26,1 ml, 41,8 mmol) vào dung dịch của 1,3-đibromo-2-metylbenzen (9,95 g, 39,8 mmol) trong THF (100 ml) ở nhiệt độ -78°C. Sau khi khuấy trong thời gian 30 phút, bổ sung từng phần (*R*)-*tert*-butyl 4-metyl-1,2,3-oxathiazoliđin-3-carboxylat 2,2-đioxit (10,39 g, 43,8 mmol) và khuấy phản ứng trong thời gian 30 phút nữa trước khi để cho ấm lên đến 0 °C trong 30 phút. Bổ sung axit xitric 1N và khuấy hỗn hợp trong thời gian 5 phút trước khi chiết nó bằng EtOAc (x2). Làm bay hơi các pha hữu cơ kết hợp. Khuấy phần cặn trong HCl 4M trong đioxan (69,7 ml, 278,7 mmol) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó làm bay hơi các chất dễ bay hơi. Tạo huyền phù phần cặn trong đietyl ete, và chiết bằng nước (x2). Bazơ hóa các pha nước kết hợp bằng cách bổ sung Na_2CO_3 2N, sau đó chiết bằng DCM (x3). Làm khô các pha hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$ và cô để thu được (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-amin (7,55 g, 83%) dưới dạng dầu màu vàng. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,13 (3H, d), 1,43 (2H, s), 2,40 (3H, s), 2,61 (1H, dd), 2,77 (1H, dd), 3,14 (1H, dq), 6,97 (1H, t), 7,08 (1H, d), 7,43 (1H, d). *m/z* (ES+), [M+H]+ = 228.

Điều chế (*R*)-*N*-(1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2-điflo-3-metoxypropan-1-amin



Bổ sung 2,2-điflo-3-metoxypropyl triflometansulfonat (3,03 g, 11,73 mmol) (chất thô từ bước trước đó) vào dung dịch của (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-amin (2,327 g, 10,2 mmol) và DIPEA (2,82 ml, 16,32 mmol) trong 1,4-đioxan (34,3 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 80°C qua đêm. Sau khi để nguội, làm bay hơi các chất dễ bay hơi, sau đó hòa tan phần cặn trong DCM và rửa bằng nước muối. Làm khô và làm bay hơi pha hữu cơ, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 100% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (*R*)-*N*-(1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2-điflo-3-metoxypropan-1-amin (2,330 g, 68%) dưới dạng dầu màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1,06 (3H, d), 2,40 (3H, s), 2,63 (1H, dd), 2,82 (1H, dd), 2,86 - 2,94 (1H, m), 2,95 - 3,11 (2H, m), 3,38 (3H, s), 3,51 - 3,63 (2H, m), 6,94 - 7 (1H, m), 7,07 (1H, dd), 7,4 - 7,51 (1H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 336.

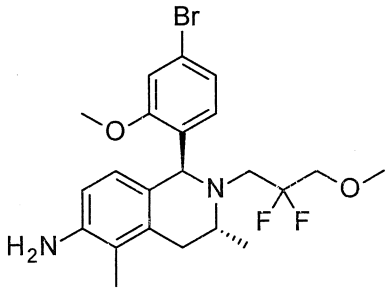
Điều chế (*R*)-3-(2-((2,2-điflo-3-metoxypropyl)amino)propyl)-2-metylanilin



Bổ sung $Pd_2(dba)_3$ (0,184 g, 0,20 mmol) và Rac-BINAP (0,250 g, 0,40 mmol) vào huyền phù của (*R*)-*N*-(1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2-điflo-3-metoxypropan-1-amin (2,25 g, 6,69 mmol), benzophenon imin (1,334 g, 7,36 mmol) và natri *tert*-butoxit (0,965 g, 10,0 mmol) trong toluen đã khử khí (28,5 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 90°C trong thời gian 3 giờ. Sau khi để nguội, làm bay hơi toluen ở mức độ lớn, sau đó hòa tan phần cặn trong DCM và rửa bằng nước. Chiết pha nước bằng DCM, sau đó làm bay hơi các chất hữu cơ đến thể tích ~50 ml. Bổ sung dung dịch HCl 2N (50 ml) và khuấy mạnh hỗn hợp hai pha này trong thời gian 30 phút. Các lớp được tách riêng, sau đó chiết lớp nước bằng DCM. Chiết pha hữu cơ trở lại bằng HCl 1N. Bazơ hóa các pha nước kết hợp bằng cách bổ sung K_2CO_3 rắn sau đó chiết bằng DCM (x3), và làm khô và làm

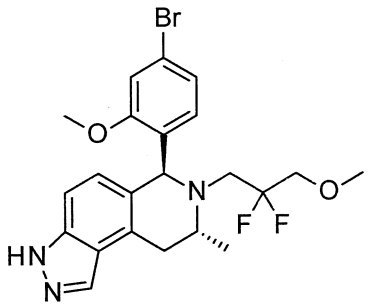
bay hơi dịch chiết DCM kết hợp để thu được (*R*)-3-(2-((2,2-điflo-3-metoxypropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,780 g, 98%) dưới dạng dầu màu nâu sáng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1,06 (3H, d), 2,11 (3H, s), 2,59 (1H, dd), 2,75 (1H, dd), 2,86 - 2,94 (1H, m), 2,94 - 3,12 (2H, m), 3,38 (3H, s), 3,53 - 3,63 (4H, m), 6,5 - 6,68 (2H, m), 6,86 - 7,01 (1H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 273.

Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



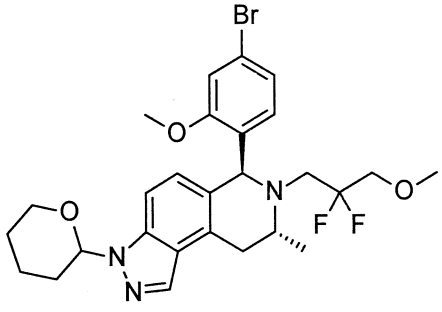
Gia nhiệt (*R*)-3-(2-((2,2-điflo-3-metoxypropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (490 mg, 1,80 mmol) và 4-bromo-2-metoxybenzalđehyt (813 mg, 3,78 mmol) trong axit axetic (8,8 ml) và nước (0,162 ml, 9,00 mmol) đến 75 °C qua đêm. Sau khi để nguội, làm bay hơi axit axetic dưới chân không, sau đó hòa tan phần cặn trong EtOAc (20 ml) và bổ sung dung dịch HCl 2N (20 ml). Khuấy hỗn hợp hai pha trong thời gian 30 phút, sau đó các lớp được tách riêng. Chiết pha hữu cơ bằng nước, sau đó bazơ hóa pha nước bằng cách bổ sung dung dịch NaOH 2N và chiết bằng DCM (x2). Làm khô và làm bay hơi các lớp DCM kết hợp, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (384 mg, 46%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,03 (3H, d), 2,07 (3H, s), 2,42 (1H, dd), 2,60 - 2,76 (2H, m), 2,99 (1H, ddd), 3,34 (1H, d), 3,36 (3H, s), 3,52 (2H, s), 3,54 - 3,66 (1H, m), 3,76 (1H, ddd), 3,87 (3H, s), 5,28 (1H, s), 6,47 (2H, s), 6,59 (1H, d), 6,88 (1H, dd), 7,01 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 469.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



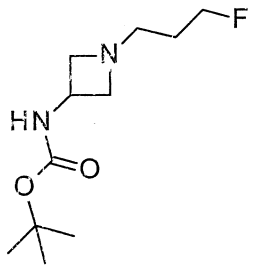
Bổ sung natri nitrit (59,8 mg, 0,87 mmol) trong nước (0,2 ml) vào dung dịch nguội của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (370 mg, 0,79 mmol) trong axit propionic (2628 µl) / nước (526 µl) ở nhiệt độ -10°C. Khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ, sau đó bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (20 ml). Dập tắt phản ứng bằng cách bổ sung dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa lạnh và khuấy trong thời gian 15 phút, trước khi để cho ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Các lớp được tách riêng và chiết lớp nước bằng EtOAc. Làm khô và làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (252 mg, 67%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,10 (3H, d), 2,72 (1H, td), 2,85 (1H, dd), 3,08 (1H, ddd), 3,16 (1H, dd), 3,36 (3H, s), 3,48 - 3,66 (2H, m), 3,65 - 3,81 (1H, m), 3,90 (3H, s), 5,44 (1H, s), 6,59 (1H, d), 6,77 (1H, d), 6,89 (1H, dd), 7,05 (1H, d), 7,19 (1H, dd), 8,07 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 480.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



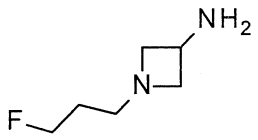
Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,064 ml, 0,70 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (240 mg, 0,50 mmol) và axit *p*-toluensulfonic hyđrat (9,51 mg, 0,05 mmol) trong DCM (2,5 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 40°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Làm khô và làm bay hơi pha hữu cơ. Cho phần cặn thô đi qua nút silicagel (EtOAc/heptan, 1:1 làm chất rửa giải) và làm bay hơi dịch lọc để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (262 mg, 93%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt ở tỉ lệ 5:1 của các chất đồng phân regioisome THP (mỗi chất đồng phân regioisome THP là hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang). *m/z*: ES+ [M+H]+ 564.

Điều chế *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat



Tạo huyền phù kali cacbonat (1,605 g, 11,61 mmol), *tert*-butyl azetiđin-3-ylcarbamat (1,0 g, 5,81 mmol) và 1-flo-3-iođopropan (1,146 g, 6,10 mmol) trong axetonitril (11,61 ml) và giữ kín trong ống vi sóng. Gia nhiệt phản ứng lên 95°C trong thời gian 15 phút trong bình phản ứng vi sóng. Làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng EtOAc (100 ml) và chiết từ $NaHCO_3$ bão hòa (50 ml). Làm khô pha hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi để thu được *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (1,248 g, 93%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 22°C) 1,44 (9H, s), 1,68 - 1,80 (2H, m), 2,56 (2H, t), 2,88 (2H, s), 3,66 (2H, t), 4,31 (1H, d), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,90 (1H, s).

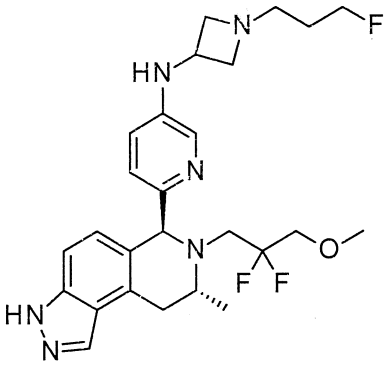
Điều chế 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung TFA (2,69 ml) vào dung dịch của *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (1,248 g, 5,37 mmol) trong DCM (8,06 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Làm bay hơi các chất dễ bay hơi và tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion, bằng cách sử dụng cột SCX. Rửa giải sản phẩm mong muốn từ cột bằng cách sử dụng NH_3/MeOH 1M và làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,697 g, 98%) dưới dạng dầu không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,66 - 1,83 (2H, m), 1,96 (3H, s), 2,54 (2H, t), 2,67 (2H, td), 3,58 - 3,70 (2H, m), 4,43 (1H, t), 4,52 (1H, t).

Ví dụ 2

6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin

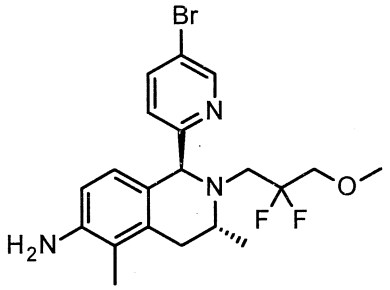


Bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′ -biphenyl)]paladi(II) metansulfonat (BrettPhos Pd G3) (6,83 mg, 8,00 µmol) và natri *tert*-butoxit (48,0 mg, 0,50 mmol) vào dung dịch đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (107 mg, 0,20 mmol) và 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (52,9 mg, 0,40 mmol) trong 1,4-đioxan (1,6 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 90°C trong thời gian 5 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng nước. Làm bay hơi pha hữu cơ, sau đó hòa tan trong DCM (2 ml), trước

khi bổ sung TFA (1 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó pha loãng bằng DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Các lớp được tách riêng và chiết lớp nước bằng DCM. Làm khô và làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong EtOAc. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được 6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (83 mg, 83%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1,12 (3H, d), 1,79 (2H, ddd), 2,71 (2H, t), 2,75 - 2,90 (2H, m), 3,06 - 3,23 (3H, m), 3,39 (3H, s), 3,51 - 3,66 (2H, m), 3,66 - 3,76 (1H, m), 3,76 - 3,84 (2H, m), 4,14 (1H, s), 4,44 (2H, t), 4,53 (1H, t), 5,06 (1H, s), 6,80 (1H, dd), 6,88 (1H, d), 7,13 (2H, dd), 7,84 (1H, d), 7,99 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 503.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin như sau:

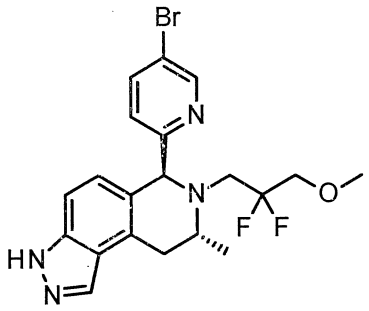
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 5-bromopicolinalđehyt (1172 mg, 6,30 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-((2,2-điflo-3-metoxypropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (817 mg, 3,00 mmol) trong axit axetic (14,7 ml) và nước (270 µl, 15,0 mmol) và gia nhiệt phản ứng lên 80°C trong thời gian 2 giờ. Sau khi để nguội, làm bay hơi các chất dễ bay hơi dưới chân không. Hòa tan phần cặn trong DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Làm bay hơi chất hữu cơ đến thể tích ~20 ml và bổ sung dung dịch HCl 2N (20 ml). Khuấy hỗn hợp hai pha trong thời gian 15 phút, sau đó phân tách. Chiết chất hữu cơ bằng nước, sau đó chiết pha nước trở lại bằng DCM. Sau

đó bazơ hóa pha nước bằng cách bổ sung K_2CO_3 rắn, sau đó chiết bằng DCM. Làm khô và làm bay hơi dịch chiết hữu cơ. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải EtOAc từ 0 đến 50% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (810 mg, 61%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1,07 (3H, d), 2,05 (3H, s), 2,49 (1H, d), 2,75 (2H, dd), 3,04 - 3,17 (1H, m), 3,30 - 3,36 (1H, m), 3,37 (3H, s), 3,58 - 3,74 (2H, m), 4,96 (1H, s), 6,51 (1H, d), 6,60 (1H, d), 7,22 (1H, d), 7,68 (1H, dd), 8,55 (1H, dd). *m/z*: ES+ [M+H]+ 440.

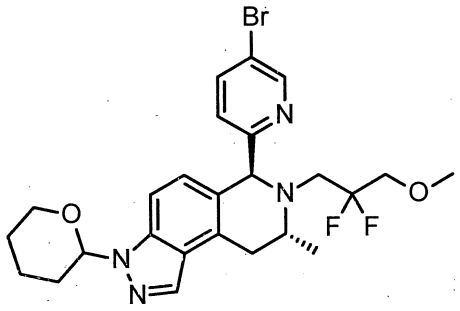
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung natri nitrit (133 mg, 1,93 mmol) trong nước (0,5 ml) vào dung dịch nguội của (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (771 mg, 1,75 mmol) trong axit propionic (5833 µl) / nước (1167 µl) ở nhiệt độ -15°C. Khuấy phản ứng trong thời gian 30 phút, sau đó bổ sung EtOAc (50 ml), mà đã được làm lạnh trong nước đá khô. Dập tắt phản ứng bằng cách bổ sung Na_2CO_3 2N đến khi sự tạo bọt khí dừng lại, sau đó các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng EtOAc, sau đó làm khô và làm bay hơi chất hữu cơ. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải EtOAc từ 0 đến 50% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (460 mg, 58%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1,14 (3H, d), 2,81 (1H, dd), 2,88 (1H, dd), 3,10 - 3,26 (2H, m), 3,38 (3H, s), 3,46 - 3,55 (1H, m), 3,58 - 3,76 (2H, m), 5,13 (1H, s), 6,94 (1H, d), 7,23 (1H, dd), 7,29 (1H,

d), 7,72 (1H, dd), 8,05 (1H, d), 8,57 (1H, dd). *m/z*: ES+ [M+H]+ 451.

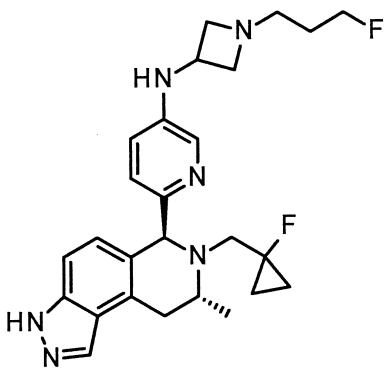
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,114 ml, 1,25 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (450 mg, 1,00 mmol) và PTSA hyđrat (37,9 mg, 0,20 mmol) trong DCM (5 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 45°C trong thời gian 3 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Làm khô và làm bay hơi pha hữu cơ, sau đó cho chất thô đi qua nút silic oxit (1:1 EtOAc/heptan). Làm bay hơi dịch lọc để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (510 mg, 9 %) dưới dạng chất rắn màu da cam (tỉ lệ ~6,5:1 của các chất đồng phân regioisome THP). *m/z*: ES+ [M+H]+ 535.

Ví dụ 3

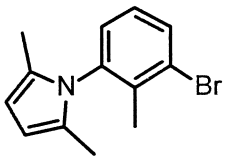
6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin



Bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′- triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′ -biphenyl)]palađi(II) metansulfonat (BrettPhos Pd G3) (12,11 mg, 0,01 mmol) và natri *tert*-butoxit (85 mg, 0,89 mmol) vào dung dịch đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (177 mg, 0,35 mmol) và 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (94 mg, 0,71 mmol) trong 1,4-đioxan (2835 µl) và gia nhiệt phản ứng lên 90°C trong thời gian 5 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng nước. Làm bay hơi pha hữu cơ, sau đó hòa tan trong DCM (2 ml), trước khi bổ sung TFA (1 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó pha loãng bằng DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Các lớp được tách riêng và chiết pha nước bằng DCM. Làm khô và làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp để tạo ra sản phẩm thô. Tinh chế sản phẩm thô bằng LCMS điều chế (cột Waters SunFire, silic oxit 5µ, đường kính 19 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 1% NH_3) và MeCN làm các chất rửa giải. Làm bay hơi các phân đoạn chứa các hợp chất mong muốn đến khô để tạo ra 6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (17,0 mg, 10%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,36 - 0,46 (1H, m), 0,49 - 0,59 (1H, m), 0,88 - 1,07 (2H, m), 1,09 (3H, d), 1,69 - 1,75 (1H, m), 1,75 - 1,81 (1H, m), 2,59 (2H, t), 2,70 (1H, dd), 2,86 - 2,96 (3H, m), 3,01 - 3,11 (1H, m), 3,37 - 3,44 (1H, m), 3,72 (2H, q), 3,78 - 3,88 (1H, m), 3,95 (1H, d), 4,04 - 4,13 (1H, m), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,95 (1H, s), 6,75 (1H, dd), 6,91 (1H, d), 7,12 - 7,17 (2H, m), 7,86 (1H, d), 8,05 (1H, d), 10,04 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 467.

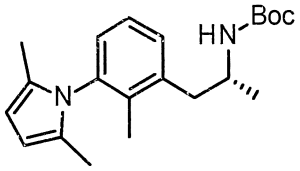
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin như sau:

Điều chế 1-(3-bromo-2-metylphenyl)-2,5-đimetyl-1*H*-pyrol



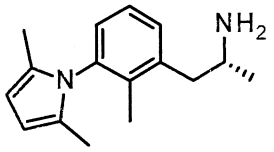
Gia nhiệt hỗn hợp của 3-bromo-2-metylanilin (40 g, 215 mmol), hexan-2,5-đion (25,3 ml, 215 mmol) và axit *p*-toluensulfonic monohyđrat (0,409 g, 2,15 mmol) trong toluen (300 ml) ở điều kiện hồi lưu trong thời gian 2 giờ trong bình thót cổ lắp với bình ngưng và ống hình chữ U Dean-Stark. Sau đó làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ trong phòng và rửa tuần tự bằng natri bicacbonat bão hòa trong nước, HCl trong nước (1N), và natri clorua bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra chất thô 1-(3-bromo-2-metylphenyl)-2,5-đimetyl-1*H*-pyrol (57,9 g, 102%) dưới dạng dầu màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,8 (6H, s), 1,9 (3H, s), 5,8 (2H, s), 7,2 - 7,4 (2H, m), 7,7 (1H, dd). m/z: ES+ [M+H]+ 264.

Điều chế *tert*-butyl (*R*)-(1-(3-(2,5-đimetyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-2-metylphenyl)propan-2-yl)carbamat



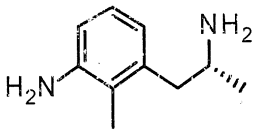
Bổ sung *n*-butyllithi trong hexan (2,5M; 89 ml, 221 mmol) trong 15 phút vào dung dịch của 1-(3-bromo-2-metylphenyl)-2,5-đimetyl-1*H*-pyrol thô (55,7 g, 211 mmol) trong THF (400 ml) ở nhiệt độ -78°C. Sau 30 phút, bổ sung *tert*-butyl (*R*)-4-metyl-1,2,3-oxathiazoliđin-3-carboxylat 2,2-đioxit (50 g, 211 mmol). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 15 phút và để cho ấm lên đến nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Bổ sung axit xitric trong nước (1N; 250 ml), và tiếp tục khuấy trong thời gian 30 phút. Chiết hỗn hợp bằng hexan, và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng natri cacbonat bão hòa trong nước, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Sử dụng *tert*-butyl (*R*)-(1-(3-(2,5-đimetyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-2-metylphenyl)propan-2-yl)carbamat thô, rắn màu nâu thu được trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. m/z: ES+ [M+H]+ 343.

Điều chế (*R*)-1-(3-(2,5-đimetyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-2-metylphenyl)propan-2-amin



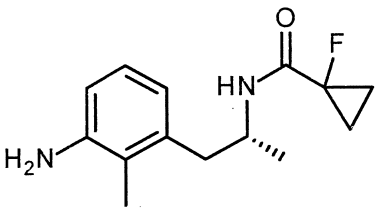
Bổ sung axit clohyđric trong đioxan (4 M; 100 ml, 400 mmol) vào huyền phù của *tert*-butyl (*R*)-(1-(3-(2,5-đimetyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-2-metylphenyl)propan-2-yl)carbamat thô trong MeOH (200 ml) và DCM (50 ml). Khuấy dung dịch màu đỏ thu được ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ và sau đó cô dưới áp suất giảm. Sử dụng chất rắn màu nâu thu được trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. m/z: ES+ [M+H]+ 243.

Điều chế (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin



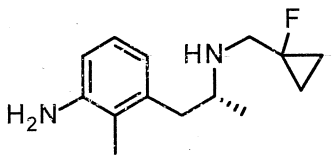
Làm ẩm hỗn hợp của (*R*)-1-(3-(2,5-đimetyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-2-metylphenyl)propan-2-amin đihyđroclorua thô, hyđroxylamin trong nước (50 % theo khối lượng; 107 ml, 1,74 mol), và hyđroxylamin hyđroclorua (97 g, 1,39 mol) trong etanol (400 ml) đến điều kiện hồi lưu. Sau 18 giờ, làm nguội phản ứng xuống 0°C, bazơ hóa bằng natri hyđroxit trong nước (50 % theo khối lượng; 153 g, 1,92 mol) và chiết bằng DCM. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng SFC (cột Princeton Chromatography DEAP, chiều dài 100 mm, đường kính 30 mm, 5 µm, nhiệt độ cột 40°C, áp suất cột 100 bar, tốc độ dòng chảy 100 mg/ml), rửa giải bằng metanol 25% chứa 0,2% NH_4OH trong CO_2, để thu được (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (24 g, 84%) dưới dạng chất rắn màu hổ phách sáng. ^1H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,05 (3H, d), 1,99 (3H, s), 2,55 (1H, dd), 2,93 (1H, dd), 3,11 - 3,25 (1H, m), 4,77 (2H, s), 6,35 (1H, dd), 6,52 (1H, dd), 6,81 (1H, t). Không quan sát thấy các proton alkyl NH_2. m/z: ES+ [M+H]+ 165.

Điều chế (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-1-floxyclopropan-1-carboxamit



Hòa tan (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (1,70 g, 10,4 mmol) trong DMF (29,9 ml) và xử lý bằng axit 1-floxyclopropan-1-carboxylic (1,00 g, 9,61 mmol), HATU (4,02 g, 10,6 mmol), và TEA (2,68 ml, 19,22 mmol). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ và sau đó dập tắt bằng nước và chiết bằng EtOAc. Rửa lớp hữu cơ bằng natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên natri sulfat, và lọc. Cô dịch lọc dưới áp suất giảm, và làm khô phần cặn thu được dưới chân không qua đêm để loại bỏ DMF dư. Sau đó hấp thụ phần cặn lên trên silic oxit và tinh chế bằng sắc ký silic oxit cột nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 80% etyl axetat trong hexan để thu được (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-1-floxyclopropan-1-carboxamit (1,47 g, 61,1%) dưới dạng chất rắn màu vàng sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,01 - 1,28 (7H, m), 2,02 (3H, s), 2,54 - 2,62 (1H, m), 2,83 (1H, dd), 3,89 - 4,16 (1H, m), 4,68 (2H, s), 6,38 (1H, d), 6,49 (1H, d), 6,78 (1H, t), 8,14 (1H, d) m/z: ES+ [M+H]+ 251.

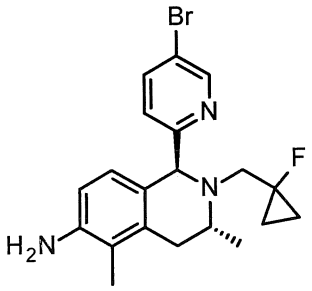
Điều chế (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin



Bổ sung phức hợp boran tetrahyđrofuran trong THF (1 M; 35,2 ml, 35,2 mmol) vào dung dịch của (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-1-floxyclopropan-1-carboxamit (1,47 g, 5,87 mmol) trong THF (13,7 ml) ở nhiệt độ trong phòng dưới nitơ. Sau đó gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 6 giờ. Làm nguội phản ứng xuống 0°C và dập tắt cẩn thận bằng MeOH (thoát khí). Sau đó cô dung dịch dưới áp suất giảm và lưu trữ trong máy kết đông trong thời gian 18 giờ. Hòa tan phần cặn trong MeOH (6 ml) và gia nhiệt ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 3 giờ. Làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit

nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 16% metanol trong DCM, để thu được (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,14 g, 82%) dưới dạng dầu không màu. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,54 - 0,70 (2H, m), 0,79 - 1,02 (5H, m), 1,64 (1H, br. s.), 1,99 (3H, s), 2,36 (1H, dd), 2,69 - 2,97 (4H, m), 4,68 (2H, s), 6,36 (1H, d), 6,49 (1H, d), 6,79 (1H, t). m/z: ES+ [M+H]+ 237.

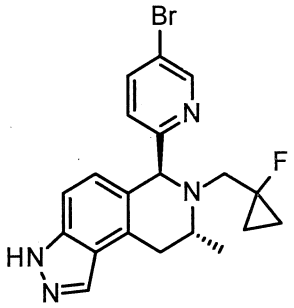
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 5-bromopicolinalđehyt (507 mg, 2,72 mmol) vào dung dịch có khuấy của (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (322 mg, 1,36 mmol) trong axit axetic (7028 µl) và nước (143 µl). Gia nhiệt hỗn hợp thu được lên 90°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 5 giờ. Cô hỗn hợp và hòa tan trong EtOAc (50 ml) và $NaHCO_3$ bão hòa (25 ml). Chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x 50 ml). Cô các chất hữu cơ kết hợp dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn trong DCM (20 ml) và 1M HCl (20 ml). Khuấy mạnh hỗn hợp trong thời gian 30 phút. Các lớp được tách riêng và rửa lớp nước bằng DCM (20 ml). Bazơ hóa lớp nước đến > độ pH 10 bằng NaOH rắn. Chiết dung dịch bằng DCM (3 x 25 ml). Làm khô các chất hữu cơ kết hợp (hộp tách pha) và cô để tạo ra sản phẩm thô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải EtOAc từ 0 đến 60% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (217 mg, 39%) dưới dạng gôm màu vàng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,33 - 0,47 (1H, m), 0,49 - 0,6 (1H, m), 0,89 - 1,01 (2H, m), 1,04 (3H, d), 2,06 (3H, s), 2,55 - 2,64 (2H, m), 2,92 - 3,04 (2H, m), 3,51 (2H, s), 3,65 - 3,72 (1H, m), 4,88 (1H, s), 6,45 (1H, d), 6,58 (1H, d), 7,31 (1H, dd), 7,66 (1H, dd), 8,54 (1H, dd). *m/z*: ES+ [M+H]+ 404.

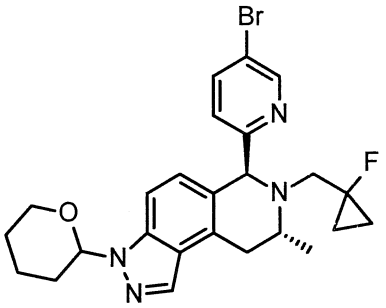
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-

6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Làm lạnh (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (295 mg, 0,73 mmol) trong axit propionic (8291 µl) xuống -20°C. Bổ sung từng giọt natri nitrit (50,3 mg, 0,73 mmol) trong nước (829 µl) trong 2-3 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -20°C trong 45 phút. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc lạnh như nước đá (30 ml). Rót hỗn hợp phản ứng vào $NaHCO_3$ bão hòa (40 ml). Khuấy mạnh hỗn hợp trong thời gian 5 phút. Các lớp được tách riêng và rửa lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa (2 x 30 ml). Chiết các lớp nước kết hợp trở lại bằng EtOAc (2 x 30 ml). Làm khô các pha hữu cơ kết hợp (Na_2SO_4) và cô để tạo ra sản phẩm thô dưới dạng dầu màu nâu. Tinh chế nguyên liệu thô bằng sắc ký cột silic oxit nhanh rửa giải bằng 0-45% EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (107 mg, 35%) dưới dạng chất rắn màu da cam. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,35 - 0,44 (1H, m), 0,51 - 0,63 (1H, m), 0,92 - 1,07 (2H, m), 1,09 (2H, d), 2,69 (1H, dd), 2,96 (1H, dd), 3,01 - 3,10 (1H, m), 3,33 - 3,49 (2H, m), 3,78 - 3,89 (1H, m), 5,03 (1H, s), 6,95 (1H, d), 7,19 (1H, d), 7,34 - 7,39 (1H, m), 7,68 (1H, dd), 8,07 (1H, d), 8,58 (1H, dd). *m/z*: ES+ [M+H]+ 415 và 417.

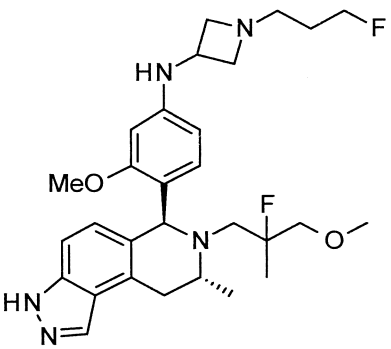
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,029 ml, 0,32 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (107 mg, 0,26 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (9,80 mg, 0,05 mmol) trong DCM (2 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 45°C trong thời gian 3 giờ. Bổ sung thêm 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,235 ml, 2,58 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (49,0 mg, 0,26 mmol) và gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 16 giờ. Pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa. Làm khô và làm bay hơi pha hữu cơ, sau đó cho chất thô đi qua nút silic oxit (1:1 EtOAc/heptan). Làm bay hơi dịch lọc để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin dưới dạng dầu màu nâu mà được sử dụng mà không tinh chế thêm. *m/z*: ES+ [M+H]+ 499.

Ví dụ 4

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang)



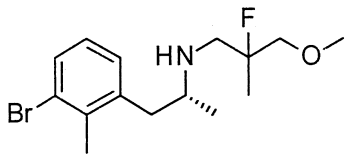
Tạo huyền phù 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (50 mg, 0,37 mmol), hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-

8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (140 mg, 0,25 mmol), xesi cacbonat (163 mg, 0,50 mmol) và [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′- triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′ -biphenyl)]paladi(II) metansulfonat (BrettPhos Pd G3) (23 mg, 0,02 mmol) trong 1,4-đioxan (2 ml) và giữ kín trong ống vi sóng. Gia nhiệt phản ứng lên 100°C trong thời gian 4 giờ dưới sự chiếu xạ vi sóng. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (25 ml) và rửa bằng nước (25 ml). Làm bay hơi lớp hữu cơ. Hòa tan phần cặn trong DCM (3 ml) và TFA (1 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ và sau đó phân chia giữa DCM và NaOH 2M (20 ml mỗi phần). Làm bay hơi pha hữu cơ và tinh chế sản phẩm thô bằng HPLC điều chế (cột Waters CSH C18 OBD, silic oxit 5µ, đường kính 30 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 1% NH_3) và MeCN làm các chất rửa giải để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (26,0 mg, 20%) dưới dạng gôm là hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,94 – 0,99 (3H, m), 1,16 – 1,24 (3H, m), 1,64 (2H, dq), 2,39 – 2,47 (3H, m), 2,70 (2H, t), 2,74 – 2,84 (2H, m), 3,03 – 3,21 (2H, m), 3,24 (3H, d), 3,48 (2H, dd), 3,58 – 3,64 (2H, m), 3,79 (3H, d), 3,88 – 3,94 (1H, m), 4,44 (2H, dt), 5,17 (1H, d), 5,88 (1H, td), 5,97 (1H, dd), 6,16 (1H, d), 6,32 – 6,38 (1H, m), 6,63 (1H, t), 7,16 (1H, dd), 8,02 (1H, s), 12,91 (1H, s). ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6, 27°C) -218,19, -149,21, -148,22. *m/z*: ES+ [M+H]+ 528.

Điều chế hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin như sau;

Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của *N*-((*R*)-1-(3-bromo-2-

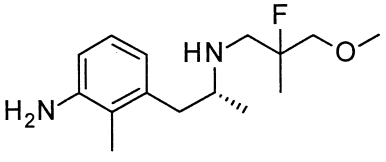
metylphenyl)propan-2-yl)-2-flo-3-metoxy-2-metylpropan-1-amin



Bổ sung triflometansulfonic anhyđrit (2,148 ml, 12,79 mmol) vào ((2-flo-3-metoxy-2-metylpropoxy)metantriyl)tribenzen (4,44 g, 12,18 mmol) được hòa tan trong điclometan (50 ml) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó bổ sung trietylsilan (2,140 ml, 13,40 mmol) và khuấy hỗn hợp trong thời gian 30 phút nữa. Cô phản ứng để thu được 2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl triflometansulfonat triệt quang thô mà được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm.

Bổ sung DIPEA (5,36 ml, 30,68 mmol) vào (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-amin (2,80 g, 12,3 mmol) và 2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl triflometansulfonat (3,12 g, 12,3 mmol) trong 1,4-đioxan (60 ml) ở nhiệt độ trong phòng dưới nitơ [tỏa nhiệt]. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 24 giờ. Để cho hỗn hợp phản ứng nguội xuống và làm bay hơi hỗn hợp phản ứng. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 60% EtOAc trong heptan để thu được *N*-((*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2-flo-3-metoxy-2-metylpropan-1-amin (2,480 g, 73%) dưới dạng dầu là hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,02 – 1,07 (3H, m), 1,31 (1,5H, d), 1,32 (1,5H, d), 2,41 (3H, s), 2,57 – 2,66 (1H, m), 2,68 – 2,90 (4H, m), 3,34 (1,5H, d), 3,35 (1,5H, d), 3,38 – 3,46 (2H, m), 6,96 (1H, t), 7,07 (1H, d), 7,42 (1H, d). NH không nhìn thấy. ^{19}F NMR (471 MHz, $CDCl_3$, 27°C) -157,94, -157,53. *m/z*: ES+ [M+H]+ 332/334.

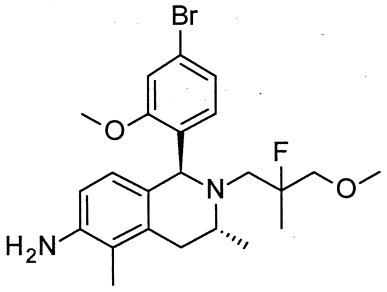
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của 3-((*R*)-2-((2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)amino)propyl)-2-metylanilin



Bổ sung tris(đibenzyliđenaxeton)đipalađi(0) (0,205 g, 0,22 mmol) và (±)-

2,2′-bis(điphenylphosphino)-1,1′-binaphtalen (0,279 g, 0,45 mmol) vào huyền phù của hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của *N*-((*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2-flo-3-metoxy-2-metylpropan-1-amin (2,48 g, 7,46 mmol), benzophenon imin (1,487 g, 8,21 mmol) và natri *tert*-butoxit (1,076 g, 11,20 mmol) trong toluen đã khử khí (30 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 90°C trong thời gian 3 giờ. Sau khi để nguội, làm bay hơi toluen. Hòa tan phần cặn trong DCM (250 ml) và rửa bằng nước (250 ml). Chiết lớp nước bằng DCM (100 ml) và cô các chất hữu cơ kết hợp đến xấp xỉ 50 ml. Bổ sung dung dịch HCl 2 M (50 ml) và khuấy mạnh hỗn hợp hai pha này trong thời gian 30 phút. Các lớp được tách riêng và chiết pha nước bằng DCM. Bazơ hóa pha nước bằng NaOH trong nước 2 M. Chiết nó bằng DCM (2 x 250 ml) và làm bay hơi dịch chiết DCM kết hợp để tạo ra 3-((*R*)-2-((2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (2,00 g, 100%) dưới dạng dầu là hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,04 (3H, d), 1,31 (1,5H, d), 1,32 (1,5H, d), 2,11 (3H, s), 2,53 – 2,60 (1H, m), 2,70 – 2,89 (4H, m), 3,35 (2H, d), 3,36 (1,5H, d), 3,43 (1,5H, dd), 3,58 (2H, s), 6,57 (1H, d), 6,61 (1H, d), 6,94 (1H, t), 7,58 (1H, s). ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl3, 27°C) -157,61, -157,30. *m/z*: ES+ [M+H]+ 269.

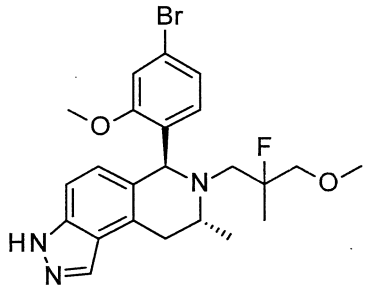
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Gia nhiệt hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của 3-((2*R*)-2-((2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (2,00 g, 7,45 mmol) và 4-bromo-2-metoxybenzalđehyt (3,37 g, 15,6 mmol) trong axit axetic (30 ml) và nước (0,671 ml, 37,3 mmol) đến 70 °C qua đêm. Sau khi để nguội, làm bay hơi axit axetic. Hòa tan phần cặn trong EtOAc (40 ml) và bổ sung dung dịch HCl 2N

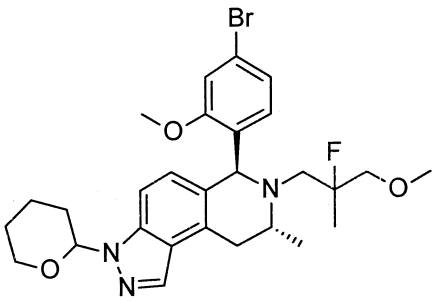
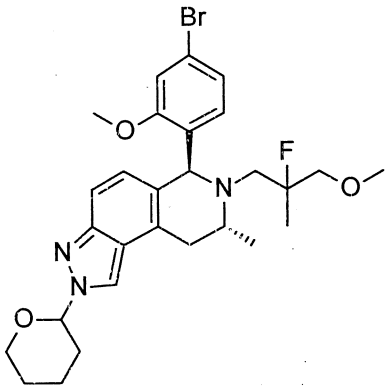
(40 ml). Khuấy hỗn hợp hai pha trong thời gian 30 phút, sau đó các lớp được tách riêng. Chiết pha hữu cơ bằng nước, sau đó bazơ hóa các pha nước kết hợp bằng cách bổ sung dung dịch NaOH 2N và chiết bằng DCM (2 x 200 ml). Làm bay hơi các lớp DCM kết hợp và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin thứ nhất (0,354 g, 10%) dưới dạng chất đồng phân lập thể không đối quang đơn lẻ. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,91 (3H, d), 1,22 (3H, d), 1,94 (3H, s), 2,26 - 2,40 (2H, m), 2,65 - 2,78 (2H, m), 3,16 - 3,25 (4H, m), 3,42 (1H, dd), 3,85 (3H, s), 4,61 (2H, s), 5,10 (1H, s), 6,24 (1H, d), 6,37 (1H, d), 6,61 (1H, d), 6,95 (1H, dd), 7,15 (1H, d). Một proton bị che khuất một phần bởi nước. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6, 27°C) -149,65. *m/z*: ES+ [M+H]+ 465/467. Sau đó là các phân đoạn chứa hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(-2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,700 g, 49%) ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6, 27°C) -149,65, -148,78. *m/z*: ES+ [M+H]+ 465/467. sau đó là các phân đoạn chứa chất đồng phân lập thể không đối quang thứ hai của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,274 g, 8%) dưới dạng chất đồng phân lập thể không đối quang đơn lẻ. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,91 (3H, d), 1,16 (3H, d), 1,93 (3H, s), 2,26 - 2,4 (2H, m), 2,63 - 2,74 (2H, m), 3,23 (3H, s), 3,35 (1H, dd), 3,47 (1H, dd), 3,85 (3H, s), 4,60 (2H, s), 5,09 (1H, s), 6,24 (1H, d), 6,37 (1H, d), 6,61 (1H, d), 6,93 (1H, dd), 7,15 (1H, d). Một proton bị che khuất bởi nước. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6, 27°C) -148,78. *m/z*: ES+ [M+H]+ 465/467. Tất cả dưới dạng gôm.

Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(-2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung dung dịch của natri nitrit (0,277 g, 4,02 mmol) trong nước (1,0 ml) vào dung dịch của hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,70 g, 3,65 mmol) trong axit propionic (15 ml) ở nhiệt độ -10°C. Khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ, sau đó bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (20 ml). Dập tắt phản ứng bằng cách bổ sung dung dịch $NaHCO_3$ trong nước (30 ml) và khuấy trong thời gian 15 phút, trước khi để cho ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Rửa pha hữu cơ bằng dung dịch $NaHCO_3$ trong nước (30 ml) và nước muối (20 ml), làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,950 g, 55%) dưới dạng chất rắn màu nâu là hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,95 - 0,97 (3H, m), 1,14 - 1,23 (3H, m), 2,31 - 2,40 (1H, m), 2,78 - 2,88 (2H, m), 3,11 - 3,21 (2,5H, s), 3,23 (1,5H, s), 3,32 - 3,38 (1H, m), 3,40 - 3,52 (2H, m), 3,88 (1,5H, s), 3,89 (1,5H, s), 5,28 (1H, s), 6,59 - 6,69 (2H, m), 6,92 - 6,96 (1H, m), 7,16 - 7,22 (2H, m), 8,05 (1H, s), 12,96 (1H, s). ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6, 27°C) -149,65, -148,68. *m/z*: ES+ [M+H]+ 476/478.

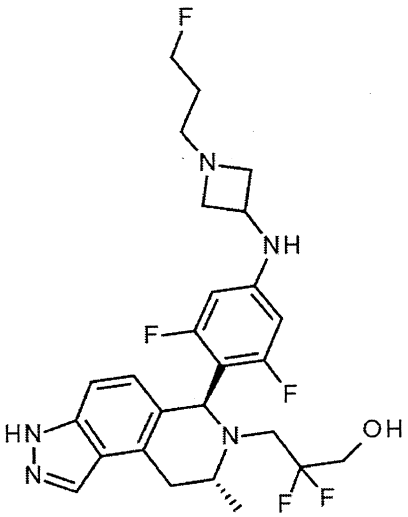
Điều chế hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

Bổ sung axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (0,038 g, 0,20 mmol) vào dung dịch của hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,950 g, 1,99 mmol) và 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,546 ml, 5,98 mmol) trong DCM (30 ml) và gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 40°C qua đêm. Bổ sung thêm 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,546 ml, 5,98 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (0,038 g, 0,20 mmol). Tiếp tục gia nhiệt trong thời gian 7 giờ. Bổ sung các phần khác nữa của 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,546 ml, 5,98 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (0,038 g, 0,20 mmol) và gia nhiệt phản ứng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (50 ml) và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (50 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ thành dầu màu nâu sẫm và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 35% EtOAc trong heptan để thu được hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,960 g, 86%) dưới dạng bọt, là hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6, 27°C) -149,79, -149,74, -149,69, -149,65, -148,77, -148,73, -148,69, -148,66. *m/z*: ES+ [M+H]+ 560/562.

Ví dụ 5

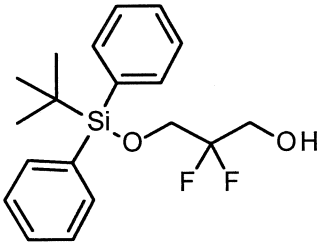
3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)phenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-7-yl)-2,2-điflopropan-1-ol



Bổ sung TBAF trong THF (1 M; 160 µl, 0,16 mmol) vào dung dịch của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (80 mg, 0,10 mmol) trong THF (0,5 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 4 giờ, cô phản ứng dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 30 đến 90% (10% MeOH trong DCM chứa 1% NH_4OH) trong DCM. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm, và tinh chế lại phần cặn thu được bằng cách sử dụng cùng điều kiện. Cô lại các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, silic oxit 5µ, đường kính 19 mm, chiều dài 100 mm) bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 0,2 % amoni hyđroxit) và MeCN làm các chất rửa giải (từ 40 đến 70% trong thời gian 7 phút) để thu được 3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)phenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)-2,2-điflopropan-1-ol (17 mg, 31%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,02 (3H, d), 1,59 - 1,69 (2H, m), 2,44 (2H, t), 2,56 - 2,67 (1H, m), 2,72 (2H, t), 2,88 (1H, dd), 3,02 - 3,13 (1H, m), 3,17 (1H, dd), 3,49 - 3,56 (1H, m), 3,57 - 3,69 (3H, m), 3,91 (1H, tdt), 4,44 (2H, dt), 5,08 (1H, s), 5,25 (1H, br. s), 6,07 (2H, d), 6,64 (1H, d), 6,69 (1H, d), 7,20 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,95 (1H, br. s). Một H không được quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]+ 524.

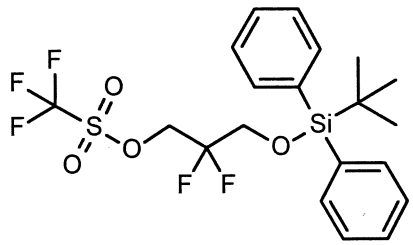
Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin như sau:

Điều chế 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropan-1-ol



Bổ sung NaH trong dầu khoáng (60 % theo khối lượng; 343 mg, 8,58 mmol) trong một phần vào dung dịch có khuấy của 2,2-điflopropan-1,3-điol (874 mg, 7,80 mmol) trong THF (32 ml) ở nhiệt độ 0°C. Để cho phản ứng ấm lên đến nhiệt độ trong phòng, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Làm lạnh lại hỗn hợp phản ứng xuống 0°C, và bổ sung từng giọt *tert*-butylđiphenylclosilan (2,0 ml, 7,8 mmol) thông qua bơm tiêm. Để cho hỗn hợp phản ứng ấm lên đến nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó dập tắt bằng nước và chiết bằng EtOAc. Làm khô lớp hữu cơ bằng Na_2SO_4, lọc, và cô dịch lọc dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, rửa giải bằng etyl axetat 5% đẳng dòng trong hexan, để thu được 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropan-1-ol (1,94, 71%) dưới dạng dầu không màu. ^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) δ ppm 1,03 - 1,14 (9H, s), 3,87 - 3,93 (4H, m), 7,37 - 7,44 (6H, m), 7,64 - 7,66 (4H, m).

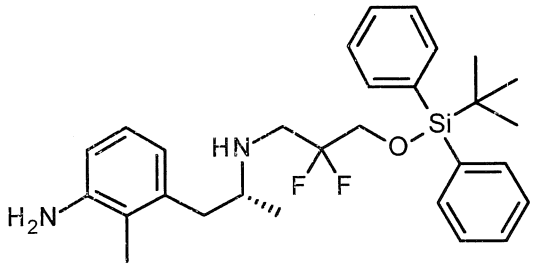
Điều chế 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl triflometan sulfonat



Làm lạnh dung dịch của 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropan-1-ol (1,94 g, 5,55 mmol) và 2,6-đimetylpyriđin (1,94 ml, 16,6 mmol) trong DCM (18 ml) xuống -10°C (bể muối/nước đá). Bổ sung từ từ triflometansulfonic

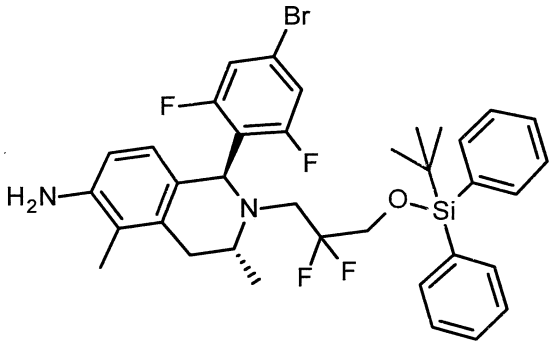
anhyđrit (1,88 ml, 11,1 mmol) từng giọt trong 10 phút. Duy trì phản ứng trong điều kiện này trong thời gian 2 giờ. Sau đó rửa phản ứng bằng nước, HCl trong nước (1N; 100 ml), và natri bicacbonat bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl triflometansulfonat (2,68 g, 100 %) dưới dạng dầu màu đỏ. ^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,03 - 1,14 (9H, s), 3,90 (2H, t), 4,76 (2H, t), 7,39 - 7,56 (6H, m), 7,59 - 7,75 (4H, m).

Điều chế 3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl triflometan sulfonat



Bổ sung 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl triflometansulfonat (1,92 g, 3,98 mmol) vào dung dịch của (R)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (0,784 g, 4,77 mmol) và DIPEA (1,031 ml, 5,97 mmol) trong 1,4-đioxan (15 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng nước. Chiết lớp nước bằng DCM, và làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên magie sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 4% amoniac trong metanol trong DCM. Cô các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (*R*)-3-(2-((3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,97 g, 100%) dưới dạng dầu màu vàng. ^{1}H NMR (300 MHz, METANOL-d_4, 27°C) δ ppm 0,97 - 1,12 (12H, m), 2,10 (3H, s), 2,53 - 2,63 (1H, m), 2,74 - 2,84 (1H, m), 2,86 - 2,99 (1H, m), 3,00 - 3,19 (2H, m), 3,80 (2H, td), 6,53 (1H, d), 6,63 (1H, d), 6,86 (1H, t), 7,38 - 7,50 (6H, m), 7,64 - 7,72 (4H, m). m/z: ES+ [M+H]+ 497.

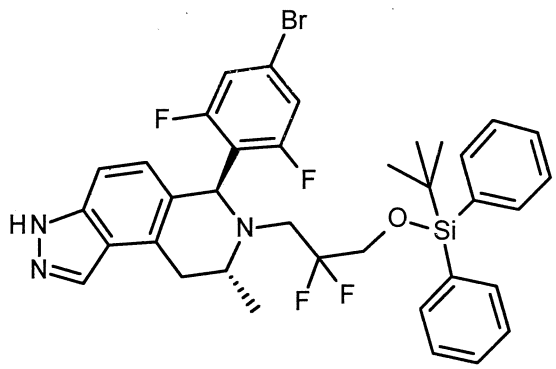
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl) oxy)-2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 4-bromo-2,6-điflobenzalđehyt (1,55 g, 7,02 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-((3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-đifloropropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,74 g, 3,51 mmol) trong axit axetic (17 ml) và nước (0,32 ml, 18 mmol), và gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 80°C qua đêm. Cô phản ứng dưới áp suất giảm, và phần cặn được phân chia giữa EtOAc và $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Cô lớp hữu cơ dưới áp suất giảm và tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 20 đến 80% etyl axetat trong hexan, để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-đifloropropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,33 g, 54,5%) dưới dạng chất rắn.

^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) δ ppm 1,04 - 1,11 (12H, m), 2,25 - 2,38 (3H, m), 2,53 - 2,65 (1H, m), 2,73 (1H, q), 2,86 - 3,03 (1H, m), 3,15 - 3,38 (1H, m), 3,52 - 3,71 (2H, m), 3,85 - 4,01 (1H, m), 5,31 (1H, d), 6,58 - 6,64 (1H, m), 6,67 - 6,73 (1H, m), 6,88 - 6,95 (2H, m), 7,18 - 7,24 (2H, m), 7,37 - 7,50 (6H, m), 7,60 - 7,70 (4H, m). m/z: ES+ [M+H]+ 699.

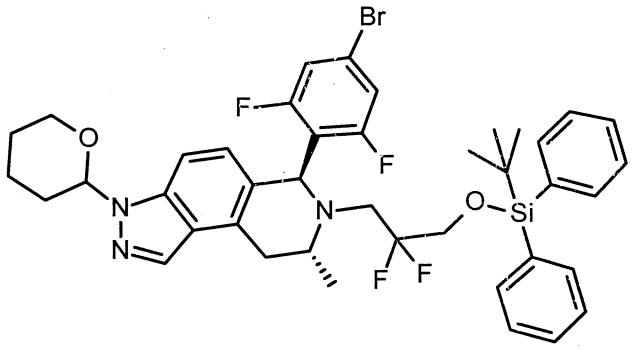
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-đifloropropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung từng giọt natri nitrit (0,130 g, 1,89 mmol) trong nước (0,900 ml) vào dung dịch của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-(3-((*tert*-

butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,32 g, 1,89 mmol) trong axit propionic (9 ml) ở nhiệt độ -8°C (bể muối/nước đá) và khuấy trong điều kiện này trong thời gian 20 phút. Pha loãng phản ứng bằng etyl axetat (20 ml, được làm lạnh từ trước xuống -10 °C) và dập tắt bằng cách bổ sung từ từ $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (30 ml, được làm lạnh từ trước xuống -10 °C) trong 15 phút ở nhiệt độ 0°C. Để cho hỗn hợp ấm lên đến nhiệt độ trong phòng và duy trì trong điều kiện này trong thời gian 18 giờ. Lớp hữu cơ được phân tách, và chiết lớp nước bằng EtOAc. Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước và nước, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 15 đến 50% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,520 g, 38,8%) dưới dạng chất rắn màu nâu sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) δ ppm 1,07 (9H, s), 1,12 (3H, d), 2,72 - 2,92 (2H, m), 3,21 - 3,39 (2H, m), 3,51 - 3,66 (1H, m), 3,67 - 3,79 (1H, m), 3,86 - 4,00 (1H, m), 5,37 (1H, s), 6,81 (1H, d), 6,87 - 6,98 (2H, m), 7,25 - 7,29 (1H, m), 7,35 - 7,50 (6H, m), 7,59 - 7,70 (4H, m), 8,14 (1H, s). Inđol NH không được quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]+ 710.

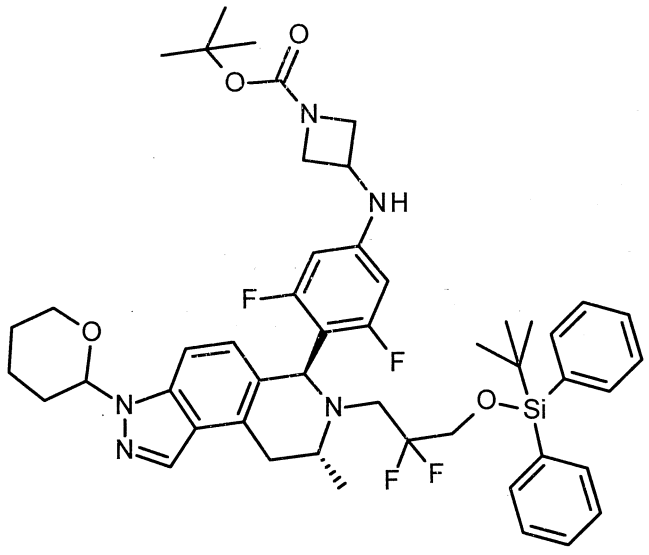
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl) oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (95 µl, 1,04 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (492 mg,

0,69 mmol) và axit *para*-toluensulfonic monohyđrat (13 mg, 0,07 mmol) trong DCM (3,5 ml), và gia nhiệt phản ứng dưới điều kiện hồi lưu trong thời gian 6 giờ. Sau khi để nguội, rửa phản ứng bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, làm khô trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 10 đến 30% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (474 mg, 86%) dưới dạng chất rắn dạng gôm màu nâu sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,06 (9H, s), 1,19 - 1,25 (3H, m), 1,74 - 1,84 (3H, m), 2,09 - 2,20 (2H, m), 2,49 - 2,67 (1H, m), 2,84 - 2,96 (2H, m), 3,27 - 3,45 (2H, m), 3,61 - 3,87 (3H, m), 4,04 (2H, d), 5,52 (1H, s), 5,66 - 5,72 (1H, m), 6,78 (1H, d), 6,94 (2H, d), 7,32 (1 H, d), 7,36 - 7,50 (6H, m), 7,60 - 7,68 (4H, m), 8,04 (1 H, s).

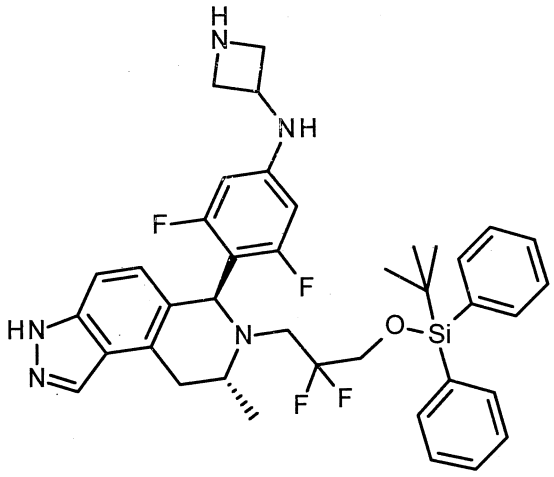
Điều chế *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat



Gia nhiệt hỗn hợp đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,474 g, 0,600 mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (0,15 g, 0,89 mmol), Xantphos (0,069 g, 0,12 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (0,06 g, 0,06 mmol), và xesi cacbonat (0,389 g,

1,19 mmol) trong đioxan (3 ml) ở nhiệt độ 115 °C trong thời gian 4 giờ. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm, và phần cặn thu được được hấp thụ trên silicagel và được tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 50% etyl axetat trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (0,377 g, 71,3%) dưới dạng chất rắn. ^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27 °C) 1,06 (9H, s), 1,12 (3H, d), 1,46 (9H, s), 1,65 - 1,84 (3H, m), 2,07 - 2,23 (2H, m), 2,58 (1H, d), 2,75 - 2,91 (2H, m), 3,16 - 3,34 (2H, m), 3,52 - 3,78 (5H, m), 3,91 - 4,07 (3H, m), 4,19 - 4,29 (2H, m), 5,23 - 5,34 (1H, m), 5,67 (1H, dd), 5,81 (2H, d), 6,81 (1H, d), 7,25 - 7,29 (1H, m), 7,35 - 7,48 (6H, m), 7,65 (4H, ddd), 8,02 (1 H, s). Anilin NH không được quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]+ 886.

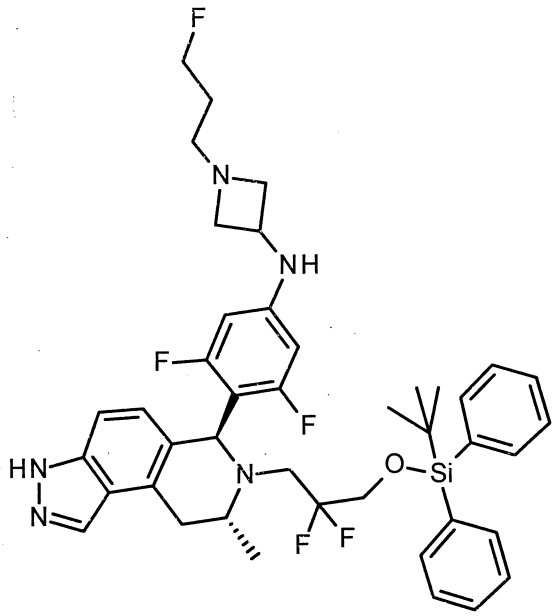
Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung từ từ TFA (328 µl, 4,25 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (377 mg, 0,43 mmol) trong DCM (2 ml) ở nhiệt độ 0°C. Để cho phản ứng ấm lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong điều kiện này trong thời gian 1 giờ. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm,

và phần cặn thu được được phân chia giữa etyl axetat và $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên MgSO4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 30 đến 70% (metanol 10% trong DCM chứa 1% amoni hyđroxit) trong DCM để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)azetiđin-3-amin (166 mg, 55,6%) dưới dạng chất rắn màu xanh xám. ^{1}H NMR (300 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,96 - 1,20 (12H, m), 2,62 - 3,03 (2H, m), 3,10 - 3,42 (2H, m), 3,42 - 3,63 (3H, m), 3,63 - 3,80 (2H, m), 3,81 - 4,08 (3H, m), 4,15 - 4,28 (1H, m), 4,38 (1H, d), 5,23 (1H, s), 5,83 (2H, m), 6,80 (1H, m), 7,15 (1H, d), 7,32 - 7,53 (6H, m), 7,61 - 7,81 (4H, m), 8,06 (1H, s). Inđazol NH không được quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]+ 702.

Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

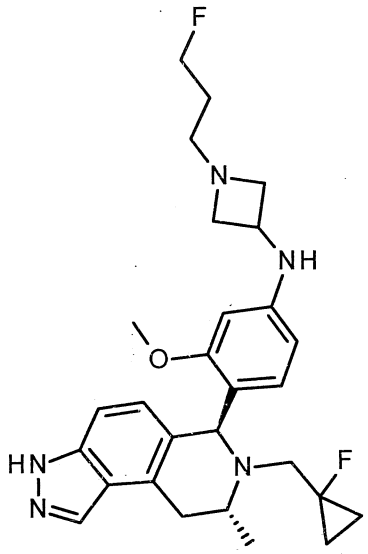


Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (40 mg, 0,21 mmol) vào dung dịch của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)azetiđin-3-amin (144 mg, 0,21 mmol) và DIPEA (107 µl, 0,62 mmol) trong DMF (1 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ và sau

đó pha loãng bằng EtOAc (40 ml) và rửa bằng natri clorua bão hòa trong nước (3 x 20 ml). Làm khô các lớp hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 15 đến 30% (metanol 10% trong DCM chứa 1% amoni hyđroxit) trong DCM, để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (87 mg, 56%) dưới dạng chất rắn màu vàng. m/z: ES+ [M+H]+ 762.

Ví dụ 6

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

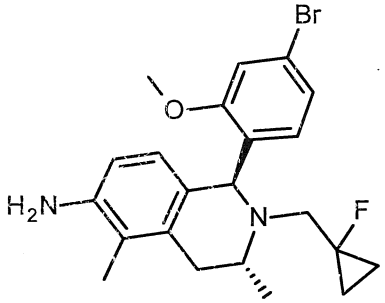


Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (40,9 µl, 0,39 mmol) vào dung dịch của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin (169 mg, 0,39 mmol) và DIPEA (203 µl, 1,16 mmol) trong NMP (1,7 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 18 giờ, cô phản ứng dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký nhanh pha đảo (C18), rửa giải bằng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 0,2 % amoni hyđroxit) và MeCN làm các chất rửa giải. Kết hợp các phân đoạn sản phẩm và làm khô lạnh để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (75 mg, 39%) dưới dạng

phần cặn trong. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,39 - 0,46 (1H, m), 0,47 - 0,54 (1H, m), 0,77 - 0,85 (2H, m), 0,91 (3H, d), 1,51 - 1,64 (2H, m), 2,38 (2H, t), 2,54 (1H, dd), 2,63 (2H, q), 2,75 - 2,90 (2H, m), 3,14 (1H, dd), 3,52 - 3,64 (3H, m), 3,73 (3H, s), 3,79 - 3,88 (1H, m), 4,38 (2H, dt), 5,10 (1H, s), 5,82 - 5,87 (1H, m), 5,91 (1H, d), 6,09 (1H, d), 6,49 (1H, d), 6,57 (1H, d), 7,07 (1H, d), 7,94 (1H, s), 12,83 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 496.

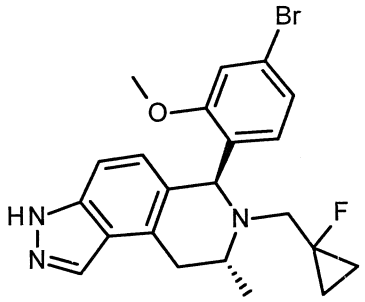
Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin như sau.

Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-((1-floxyclopropyl) metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



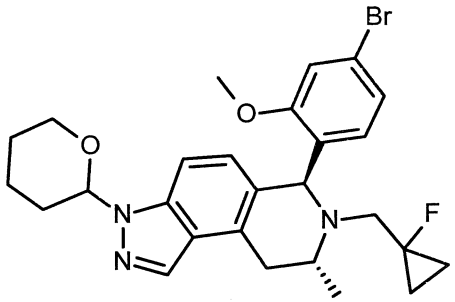
Gia nhiệt (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (451 mg, 1,91 mmol) và 4-bromo-2-metoxybenzalđehyt (410 mg, 1,91 mmol) trong hỗn hợp của nước (172 mg, 9,54 mmol) và axit axetic (7,5 ml) ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 6 giờ. Cô phản ứng dưới áp suất giảm, và xử lý phần cặn thu được bằng HCl trong nước (1N; 18 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 18 giờ. Sau đó làm nguội phản ứng và bổ sung $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Chiết hỗn hợp bằng DCM, và cô lớp hữu cơ dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 35% etyl axetat trong hexan, để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (591 mg, 71,5%) dưới dạng màng dạng gôm. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,42 - 0,61 (2H, m), 0,81 - 0,91 (2H, m), 0,93 (3H, d), 1,93 (3H, s), 2,43 - 2,48 (2H, m), 2,72 - 2,89 (2H, m), 3,48 - 3,57 (1H, m), 3,87 (3H, s), 4,57 (2H, s), 5,12 (1H, s), 6,24 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,82 (1H, d), 6,96 (1H, d), 7,16 (1 H, d). m/z: ES+ [M+H]+ 433.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl) metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



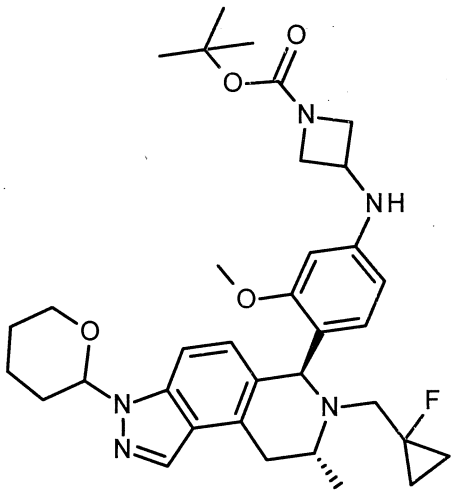
Bổ sung axit axetic (0,392 ml, 6,84 mmol) vào (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,593 g, 1,37 mmol) trong $CHCl_3$ (5 ml), và làm nguội dung dịch thu được xuống 0°C. Bổ sung isopentyl nitrit (0,321 g, 2,74 mmol) trong $CHCl_3$ (1 ml) vào phản ứng từng giọt, và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 2 giờ nữa. Sau đó bổ sung từ từ $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (1 g trong 20 ml nước). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 10 phút, và sau đó các lớp được tách riêng. Tinh chế lớp hữu cơ bằng cách sắc ký cột nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 35% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,299 g, 49,2%) dưới dạng chất rắn màu nâu sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) δ ppm 0,39 - 0,65 (2H, m), 0,77 - 0,96 (2H, m), 1,00 (3H, d), 2,52 - 2,63 (1H, m), 2,87 - 3,03 (2H, m), 3,21 - 3,28 (1H, m), 3,71 (1 H, d), 3,92 (3H, s), 5,31 (1H, s), 6,65 (1H, d), 6,86 - 6,92 (1H, m), 6,97 (1H, m), 7,18 (1H, d), 7,23 (1H, d), 8,05 (1H, s), 12,94 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]+ 444.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl) metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (176 µl, 1,93 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (286 mg, 0,64 mmol) và axit *para*-toluensulfonic monohyđrat (12 mg, 0,060 mmol) trong DCM (2,5 ml). Phản ứng được đưa vào điều kiện vi sóng (100°C, 300W) trong thời gian 6 giờ. Khi nguội, rửa phản ứng bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, làm khô trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 10 đến 30% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (299 mg, 88%) dưới dạng chất rắn dạng gôm màu nâu sáng. m/z: ES+ [M+H]+ 528.

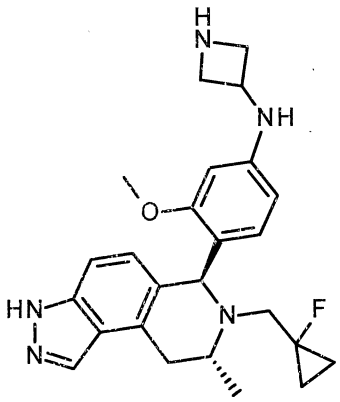
Điều chế *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat



(6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-

f]isoquinolin (278 mg, 0,53 mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (136 mg, 0,79 mmol), xesi cacbonat (343 mg, 1,05 mmol), và tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (24 mg, 0,030 mmol) trong đioxan (2,5 ml) được đưa vào điều kiện vi sóng (100°C, 300W) trong thời gian 6 giờ. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm, và phần cặn thu được được hấp thụ trên silicagel trước khi tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 20 đến 60% etyl axetat trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (296 mg, 91%). m/z: ES+ [M+H]+ 620.

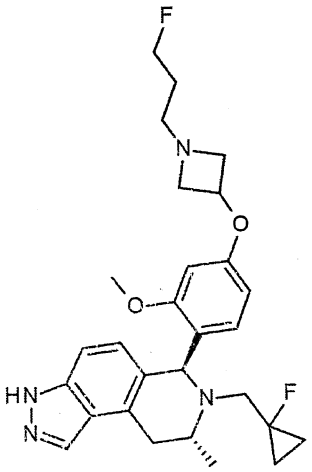
Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung từng giọt HCl trong đioxan (4 M; 1,2 ml, 4,78 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (296 mg, 0,48 mmol) trong MeOH (3,5 ml). Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, cô phản ứng dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được trong MeOH (2 ml). Sau đó tải dung dịch này lên hộp chứa trao đổi ion SCX-2 mà đã được xử lý trước bằng metanol. Rửa hộp chứa bằng metanol và sau đó amoniac 7N trong metanol. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin (181 mg, 87%) dưới dạng chất rắn màu xanh xám. m/z: ES+ [M+H]+ 436.

Ví dụ 7

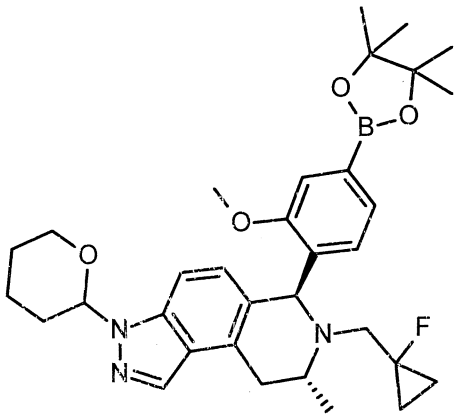
(6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (5,79 µl, 0,05 mmol) vào dung dịch của muối của axit trifloaxetic (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,030 g, 0,050 mmol) và DIPEA (0,029 ml, 0,16 mmol) trong NMP (0,52 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 giờ, pha loãng phản ứng bằng EtOAc (40 ml) và rửa bằng natri clorua bão hòa trong nước (3 x 20 ml). Làm khô lớp hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 15 đến 30% (MeOH trong DCM chứa 1% amoni hyđroxit) trong DCM để thu được (6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (5 mg, 18%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, Metanol-d_4, 26 °C) 0,45 - 0,56 (2H, m), 0,85 - 1,03 (2H, m), 1,12 (3H, d), 1,67 - 1,81 (2H, m), 2,50 - 2,62 (1H, m), 2,61 - 2,68 (2H, m), 2,92 (1H, dd), 3,08 - 3,21 (3H, m), 3,25 - 3,28 (1H, m), 3,70 - 3,84 (3H, m), 3,86 - 3,91 (3H, m), 4,45 (2H, dt), 4,73 - 4,82 (1H, m), 5,49 (1H, br. s), 6,19 (1H, d), 6,50 (1H, br. s.), 6,72 (1H, d), 6,79 (1H, d), 7,18 (1H, d), 8,05 (1H, s). Inđazol NH không được quan sát thấy. *m/z*: ES+ [M+H]+ 497.

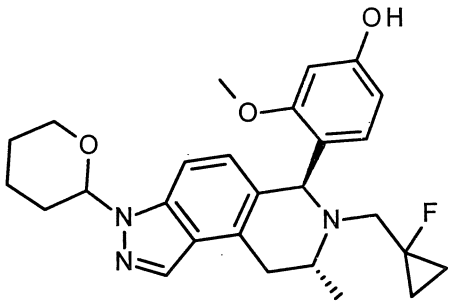
Điều chế muối của axit trifloaxetic *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin như sau:

Điều chế (6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(2-metoxy-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)phenyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



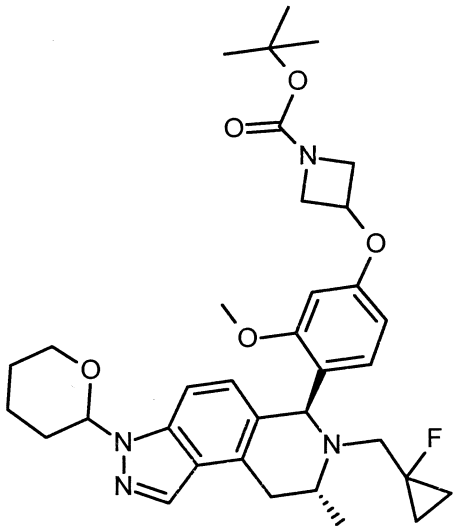
Khử khí hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (369 mg, 0,70 mmol; được điều chế theo Ví dụ 6), bis(pinacolato)đibo (266 mg, 1,05 mmol), [1,1'-bis(điphenylphosphino)feroxen]điclopalađi(II) (51 mg, 0,070 mmol) và kali axetat (233 mg, 2,37 mmol) trong đioxan (3,50 ml) và sục bằng nitơ. Sau đó làm ấm hỗn hợp phản ứng lên 80°C. Sau khi khuấy trong điều kiện này trong thời gian 18 giờ, làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, lọc qua miếng Celite®, và rửa bằng EtOAc(100 ml). Rửa dịch lọc bằng nước (100 ml), chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x 70 ml), và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước (3 x 70 ml) và natri clorua bão hòa trong nước (50 ml) trước khi làm khô trên MgSO4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 25% etyl axetat trong hexan để thu được (6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(2-metoxy-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)phenyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (186 mg, 46,3%) dưới dạng chất rắn màu vàng. m/z: ES+ [M+H]+ 576.

Điều chế 4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenol



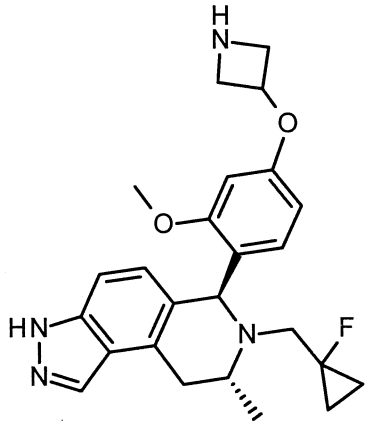
Bổ sung từng giọt hyđro peroxit trong nước (33%; 75 µl, 0,74 mmol) vào dung dịch có khuấy của (6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(2-metoxy-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-đioxaborolan-2-yl)phenyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (186 mg, 0,32 mmol) và natri hyđroxit trong nước (1 M; 350 µl, 0,32 mmol) trong THF (2,5 ml) ở nhiệt độ 5°C dưới không khí. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 5 phút. Sau đó pha loãng phản ứng bằng nước (50 ml) và DCM (100 ml). Các lớp được tách riêng, và chiết lớp nước bằng DCM (2 x 50 ml). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 20 đến 50% etyl axetat trong hexan, để thu được 4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenol (94 mg, 62,5 %) dưới dạng chất rắn màu vàng. m/z: ES+ [M+H]+ 466.

Điều chế *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat



Bổ sung đietyl (E)-điazen-1,2-đicarboxylat (88 mg, 0,20 mmol) vào dung dịch của 4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenol (94 mg, 0,20 mmol), *tert*-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat (35 mg, 0,20 mmol), triphenylphosphin (53 mg, 0,20 mmol) và toluen (2,03 ml). Sau đó làm ấm phản ứng lên 110°C. Sau 15 giờ, làm nguội phản ứng, cô dưới áp suất giảm, và tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% etyl axetat trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat (95 mg, 75%). m/z: ES+ [M+H]+ 621.

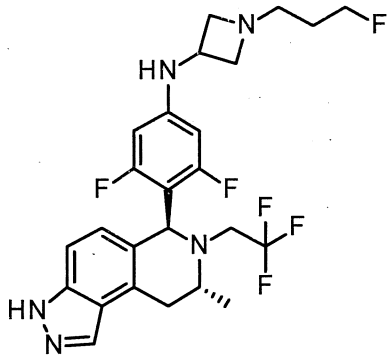
Điều chế muối của axit trifloaxetic tert-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat



Bổ sung từng giọt HCl trong đioxan (4N; 383 µl, 1,53 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat (95 mg, 0,15 mmol) trong MeOH (1 ml), và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Cô phản ứng dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký nhanh pha đảo, bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 0,01% TFA) và MeCN làm các chất rửa giải (từ 20 đến 80%) để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (30 mg, 36%) dưới dạng muối TFA. ^{1}H NMR (300 MHz, METANOL-d_4, 27°C) 0,86 - 1,09 (2H, m), 1,26 - 1,52 (3H, m), 1,59 (3H, d), 3,22 - 3,31 (1H, m), 3,36 - 3,47 (1H, m), 3,66 (1 H, dd), 4,03 (3H, s), 4,07 - 4,27 (4H, m), 4,52 - 4,62 (2H, m), 5,14 - 5,27 (1H, m), 6,33 (1H, dd), 6,57 - 6,63 (1H, m), 6,68 (1H, d), 6,75 (1 H, s), 6,93 (1H, d), 7,50 (1H, d), 8,23 (1H, s). Inđazol NH và sự cộng thêm H không được quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]+ 437.

Ví dụ 8

N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

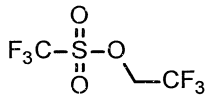


Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (5,4 µl, 0,050 mmol) và điisopropyletylamin (0,013 ml, 0,070 mmol) vào dung dịch có khuấy của *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (22 mg, 0,050 mmol) trong NMP (0,4 ml) ở nhiệt độ môi trường. Sau 16 giờ tinh chế phản ứng thô một cách trực tiếp bằng HPLC điều chế đảo pha (cột Waters XBridge C18, đường kính 19 mm, chiều dài 100 mm,

silic oxit 5 µm), gradien rửa giải từ 40 đến 70% MeCN trong nước chứa amoni hyđroxit 0,2% làm chất cải biến. Cô các phân đoạn sản phẩm đến khô để thu được *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (9 mg, 36%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2, 27°C) 1,11 (3H, d), 1,69 - 1,78 (3H, m), 2,51 - 2,59 (2H, m), 2,81 - 2,94 (3H, m), 2,95 - 3,03 (1H, m), 3,16 - 3,30 (1H, m), 3,59 - 3,70 (3H, m), 3,94 - 4,05 (1H, m), 4,41 (1H, t), 4,45 (1H, d), 4,51 (1H, t), 5,27 (1H, s), 6,02 (2H, d), 6,83 (1H, d), 7,21 (1H, d), 8,03 (1H, s), 10,47 (1H,br. s). m/z: ES+ [M+H]+ 512.

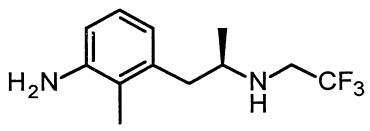
Điều chế *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin như sau;

Điều chế 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat



Bổ sung từng giọt triflometansulfonic anhyđrit (3,14 ml, 18,6 mmol) qua bơm tiêm trong 5 phút vào dung dịch có khuấy của 2,2,2-trifloethan-1-ol (1,23 ml, 16,9 mmol) và 2,6-đimetylpyriđin (2,36 ml, 20,3 mmol) trong DCM (50 ml) ở nhiệt độ -10°C. Sau 2 giờ rửa phản ứng liên tục bằng HCl trong nước (1N; 2 x 30 ml) và $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (20 ml). Sau đó làm khô lớp hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm để tạo ra 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (0,92 g, 23%) dưới dạng dầu màu đỏ. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 4,69 (2H, q).

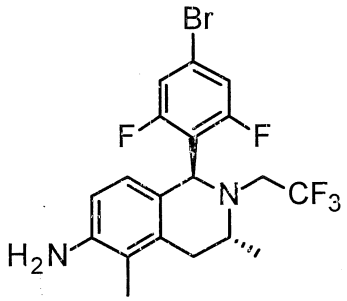
Điều chế (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin



Bổ sung 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (1,3 g, 2,8 mmol) vào dung dịch có khuấy của (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (0,460 g, 2,80 mmol; được điều chế theo Ví dụ 3) và điisopropyletylamin (0,636 ml, 3,64 mmol) trong 1,4-đioxan (10 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 15 giờ và sau đó làm nguội và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong

EtOAc (50 ml) và rửa bằng hỗn hợp của $NaHCO_3$ bão hòa trong nước và natri clorua bão hòa trong nước. Chiết lớp nước bằng EtOAc (20 ml), và làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong MeOH, hấp thụ trên đất điatomit dưới áp suất giảm, và tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 1 đến 6% MeOH trong DCM. Cô các phân đoạn sản phẩm đến khô để thu được (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (0,30 g, 44%) dưới dạng gôm màu da cam nhạt. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,07 (3H, d), 2,09 (3H, s), 2,63 (1H, dd), 2,76 (1H, dd), 2,92 - 3,05 (1H, m), 3,15 (2H, q), 6,58 (2H, d), 6,85 - 7,00 (1H, m). Tín hiệu đối với ba NH không được quan sát thấy. m/z: ES+ [M+H]+ 247.

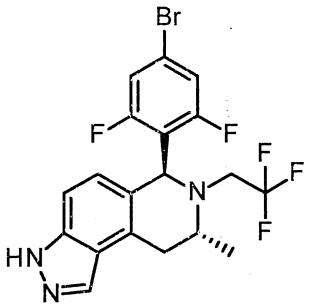
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Gia nhiệt (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (303 mg, 1,23 mmol) và 4-bromo-2,6-điflobenzalđehyt (544 mg, 2,46 mmol) trong hỗn hợp của axit axetic (5 ml) và nước (0,111 ml) ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 2 giờ. Để phản ứng nguội từ từ xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy qua đêm. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được trong EtOAc (30 ml) và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (2 x 20 ml). Chiết các lớp nước kết hợp bằng EtOAc (2 x 20 ml), và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước và cô đến thể tích tối thiểu (~20 ml). Bổ sung HCl trong nước (1N; 20 ml), và khuấy mạnh hỗn hợp hai pha này trong thời gian 2 giờ. Các lớp được tách riêng, và chiết lớp nước bằng EtOAc (20 ml). Bazơ hóa lớp nước bằng cách bổ sung natri cacbonat rắn (đến khi độ pH ~8 như đo được bằng cách sử dụng giấy kiểm tra độ pH) và sau đó chiết bằng DCM (3 x 20 ml). Làm khô dịch chiết DCM kết hợp trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm để

thu được 40 mg sản phẩm thô. Trong khi đó, rửa dịch chiết EtOAc kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước và cô đến khô. Hòa tan phần cặn thu được trong THF (10 ml) và khuấy với tosylhyđrazit liên kết polystyren (1,03 g, 2,76 mmol) trong thời gian 14 giờ. Lọc hỗn hợp, và rửa nhựa liên tục bằng THF (10 ml) và MeOH (3 x 10 ml). Kết hợp dịch lọc với xấp xỉ 40 mg sản phẩm thô thu được từ trước và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn cuối cùng bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn sản phẩm đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (230 mg, 41%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,04 (3H, d), 2,42 (3H, s), 2,58 (1H, dd), 2,74 - 2,87 (1H, m), 3,02 - 3,28 (2H, m), 3,46 - 3,59 (1H, m), 5,27 (1H, s), 6,66 (1H, d), 7,02 (2H, d), 7,32 (1H, d), 9,95 - 10,73 (2H, br. s). m/z: ES+ [M+H]+ 449.

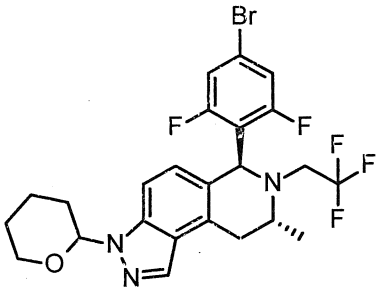
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung từng giọt dung dịch của natri nitrit (35 mg, 0,51 mmol) trong nước (0,20 ml) trong 1 phút vào dung dịch có khuấy của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (230 mg, 0,51 mmol) trong axit propionic (2 ml) ở nhiệt độ xấp xỉ -20°C (bể nước đá-NaCl). Sau 15 phút pha loãng phản ứng bằng EtOAc lạnh như nước đá (15 ml). Khuấy mạnh hỗn hợp hai pha này trong điều kiện này và trung hòa bằng cách bổ sung từ từ Na_2CO_3 rắn (đến khi có tính bazơ như đo được bằng cách sử dụng giấy kiểm tra độ pH). Loại bỏ bể làm lạnh. Các pha được tách riêng, và rửa lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (2 x 15 ml), natri clorua bão hòa trong nước (15 ml), làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần

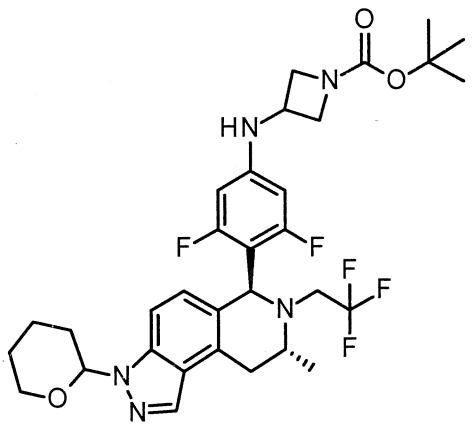
cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 35% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn sản phẩm đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (104 mg, 45%) dưới dạng màng màu da cam nhạt. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,15 (3H, d), 2,89 - 3,04 (2H, m), 3,20 - 3,36 (1H, m), 3,50 (1H, dd), 3,61 - 3,75 (1H, m), 5,41 (1H, s), 6,80 (1H, d), 7,01 - 7,11 (2H, m), 7,23 (1H, d), 8,10 (1H, s), 10,24 (1H, br. s). m/z: ES+ [M+H]+ 460.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



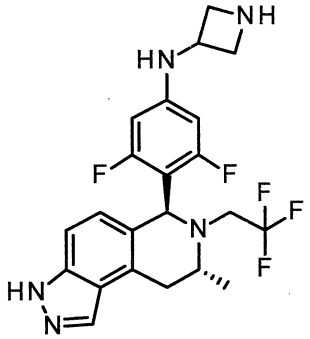
Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,103 ml, 1,13 mmol) và axit *p*-toluensulfonic monohyđrat (2 mg, 0,01 mmol) vào dung dịch có khuấy của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (104 mg, 0,23 mmol) trong DCM (1,5 ml). Duy trì phản ứng dưới điều kiện hồi lưu trong thời gian 1 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM, rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn sản phẩm đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (117 mg, 95%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. m/z: ES+ [M+H]+ 544.

Điều chế tert-butyl 3-((3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat



Nạp vào lọ với thanh khuấy, (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (55 mg, 0,10 mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (26 mg, 0,15 mmol), Pd_2dba_3 (9 mg, 0,01 mmol), Xantphos (12 mg, 0,02 mmol), và xesi cacbonat (99 mg, 0,30 mmol). Bịt kín lọ và làm bay hơi/làm đầy lại bằng nitơ (3x) trước khi bổ sung 1,4-đioxan đã khử khí (1 ml) thông qua bơm tiêm. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 phút sau đó đặt trong khối gia nhiệt đã được gia nhiệt từ trước lên 90°C. Sau 22 giờ, để cho hỗn hợp nguội xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó pha loãng bằng EtOAc. Lọc hỗn hợp qua đất điatomit, và cô dịch lọc dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 45% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn sản phẩm đến khô để thu được *tert*-butyl 3-((3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (46 mg, 72%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,08 (3H, d), 1,42 (9H, s), 1,55 - 1,81 (4H, m), 1,97 - 2,23 (2H, m), 2,45 - 2,63 (1H, m), 2,80 - 3,02 (2H, m), 3,09 - 3,27 (1H, m), 3,34 - 3,47 (1H, m), 3,53 - 3,65 (1H, m), 3,66 - 3,75 (3H, m), 3,92 - 4,02 (1H, m), 4,19 - 4,32 (3H, m), 5,25 (1H, s), 5,58 - 5,67 (1H, m), 5,93 (2H, dd), 6,81 (1H, d), 7,22 - 7,27 (1H, m), 7,98 (1H, s). Sự gối một phần của mức bội từ 7,22 đến 7,27 phần triệu với cloroform. m/z: ES+ [M+H]+ 636.

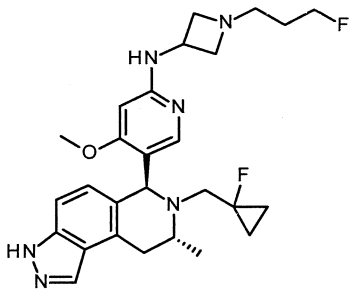
Điều chế *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin



Hòa tan tert-butyl 3-((3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (46 mg, 0,08 mmol) trong axit formic (0,50 ml, 13 mmol), và dung dịch có khuấy này ấm lên đến 30°C. Sau 27 giờ cô phản ứng dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong IPA/DCM 5% và trung hòa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Các pha được tách riêng, và chiết lớp nước bằng IPA/DCM 5% (2 x 4 ml). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin thô (38 mg, 111%) tạp nhiễm lượng nhỏ của nguyên liệu bắt đầu được khử bảo vệ một phần dưới dạng màng màu vàng nhạt. m/z: ES+ [M+H]+ 452.

Ví dụ 9

5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin

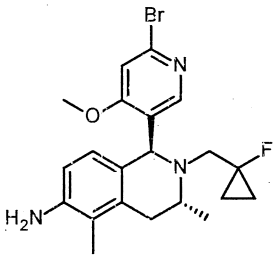


Bổ sung tuần tự DMF (1 ml) và DIPEA (0,022 ml, 0,13 mmol) vào bình thót cổ đã nạp *N*-(azetiđin-3-yl)-5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin (22 mg, 0,050 mmol). Sau đó bổ sung 1-flo-3-iođopropan (9 mg, 0,05 mmol)

trong DMF (0,1 ml). Sau 2 giờ, pha loãng phản ứng bằng natri clorua bão hòa trong nước, và chiết hỗn hợp trong EtOAc (3x). Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước và làm khô trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế màng thô thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 2 đến 10% MeOH trong DCM, để tạo ra 5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin (9,0 mg, 36%) dưới dạng màng khô. ^{1}H NMR (500 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) δ ppm 0,46 - 0,66 (2H, m), 0,85 - 1,05 (2H, m), 1,09 (3H, d), 1,64 - 1,78 (2H, m), 2,50 - 2,61 (3H, m), 2,83 (1H, dd), 2,87 - 2,96 (2H, m), 3,04 - 3,21 (2H, m), 3,56 - 3,69 (2H, m), 3,70 - 3,76 (1H, m), 3,85 (3H, s), 4,30 - 4,37 (1H, m), 4,45(2H, dt), 4,93 (1H, br d), 5,32 (1H, s), 5,82 (1H, s), 6,76 (1H, d), 7,00 (1H, d), 7,32 (1H, s), 7,99 (1H, s), 11,00 (1H, br s). *m/z* : ES+ [M+H]+ 497

Điều chế *N*-(azetiđin-3-yl)-5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin như được mô tả dưới đây

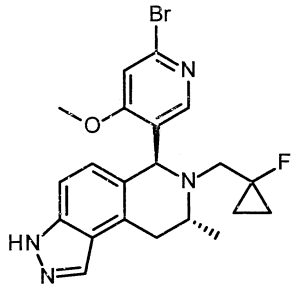
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-2-((1-floxyclopropyl) metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 6-bromo-4-metoxynicotinalđehyt (1,46 g, 6,77 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (0,800 g, 3,39 mmol) trong AcOH (27 ml) và nước (0,305 g, 16,9 mmol), và gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi để nguội, cô phản ứng dưới áp suất giảm, và pha loãng phần cặn thu được bằng etyl axetat và bazơ hóa bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước. Kết hợp lớp hữu cơ với HCl trong nước (1N), và khuấy hỗn hợp hai pha ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Rửa lớp hữu cơ bằng HCl trong nước (1N), sau đó chiết các lớp nước kết

hợp bằng etyl axetat. Sau đó bazơ hóa lớp nước bằng cách bổ sung K_2CO_3 rắn và chiết bằng etyl axetat (2x). Làm khô các dịch chiết etyl axetat kết hợp từ lớp nước đã được bazơ hóa trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký nhanh silic oxit građien rửa giải từ 10 đến 100% etyl axetat trong hexan để thu được (1*S*,3*R*)-1-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,450 g, 30,6%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 27°C) δ ppm 0,47 - 0,64 (2 H, m), 0,87 - 0,98 (5 H, m), 1,95 (3 H, s), 2,42 - 2,48 (1H, m), 2,79 (1H, dd), 2,87 - 2,99 (1H, m), 3,41 - 3,50 (H, m), 3,92 - 3,97 (3H, m), 4,66 (2H, s), 5,11 (1H, s), 6,30 (1H, d), 6,39 (1H, d), 7,26 (1H, s), 7,64 (1H, s). Một hyđro bị che khuất bởi DMSO. *m/z* : ES+ [M+H]+ 434.

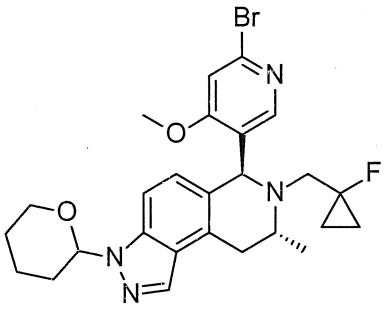
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl) metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



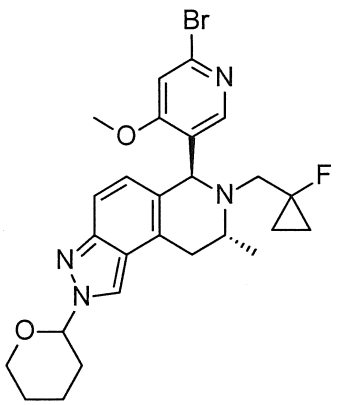
Bổ sung từng giọt dung dịch của natri nitrit (0,045 g, 0,65 mmol) trong nước (0,75 ml) vào dung dịch của (1*S*,3*R*)-1-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,270 g, 0,62 mmol) trong axit propionic (3,0 ml) ở nhiệt độ -15°C (bể muối/nước đá), và khuấy phản ứng trong điều kiện này 1 giờ. Bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (10 ml) sau đó là $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (15 ml) từng phần. Các lớp được tách riêng, và rửa lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (2X). Chiết các lớp nước kết hợp (độ pH=8) bằng EtOAc, và sau đó làm khô tất cả các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký nhanh silic oxit, građien rửa giải từ 20 đến 60% etyl axetat trong hexan để tạo ra (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,11 g, 41%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6,

27°C) 0,47 - 0,64 (2H, m), 0,87 - 0,97 (2H, m), 0,97 - 1,01 (3H, m), 2,51 - 2,63 (1H, m), 2,89 (1H, dd), 2,94 - 3,06 (1H, m), 3,23 (1H, br dd), 3,54 - 3,67 (1H, m), 3,97 (3H, s), 5,28 (1H, s), 6,68 (1H, d), 7,21 (1H, d), 7,30 (1H, s), 7,68 (1H, s), 8,06 (1H, s), 12,98 (1 H, br s). *m/z* : ES+ [M+H]+ 445.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxy-3-pyridyl)-7-[(1-floxyclopropyl) metyl]-8-metyl-3-[(2*R*)-tetrahyđropyran-2-yl]-8,9-đihyđro-6*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



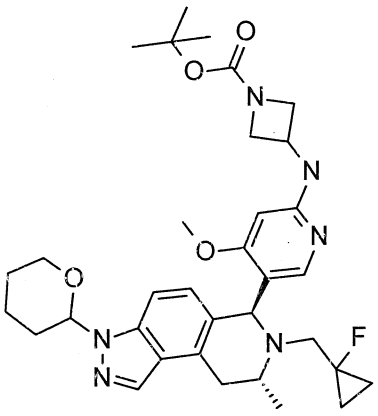
và



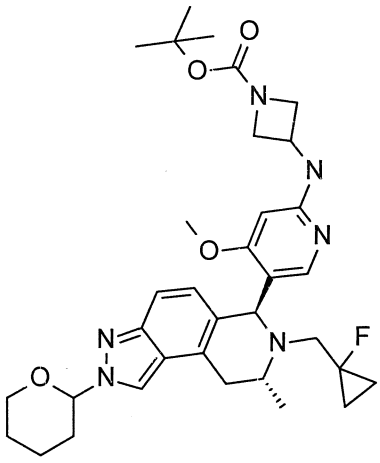
Bổ sung DCM (4 ml) vào bình thót cổ đã nạp (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (150 mg, 0,34 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (71 mg, 0,37 mmol). Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (43 mg, 0,51 mmol) vào phản ứng có khuấy, và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Rửa phản ứng bằng natri hyđrocarbonat bão hòa trong nước, và làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm để tạo ra gôm màu nâu thô. Tinh chế nó bằng sắc ký nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 40% EtOAc trong hexan để tạo ra hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxy-3-pyridyl)-7-[(1-floxyclopropyl)metyl]-8-metyl-3-[(2*R*)-tetrahyđropyran-2-yl]-8,9-đihyđro-6*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (151 mg, 85%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,45 - 0,61 (2H, m), 0,96 - 1,06 (2H, m), 1,09 (3H, d), 1,46 - 1,91 (3H, m), 2,03 - 2,20 (2H, m), 2,47 - 2,63 (2H, m), 2,88 (1H,

ddd), 3,14 (1H, dd), 3,20 - 3,31 (1 H, m), 3,64 - 3,79 (2H, m), 3,96 (3H, d), 3,98 - 4,06 (1H, m), 5,40 (1H, d), 5,64 - 5,71 (1H, m), 6,78 (1H, d), 6,99 (1H, d), 7,25 - 7,33 (1H, m), 7,76 (1H, d), 8,02 (1H, d).

Điều chế *tert*-butyl 3-((5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-yl)amino)azetiđin-1-carboxylat và *tert*-butyl 3-(5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-ylamino)azetiđin-1-carboxylat



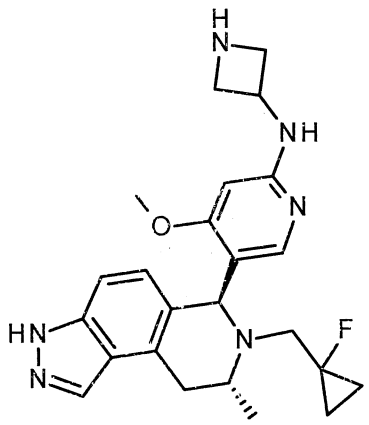
và



Bổ sung đioxan (2,7 ml) vào bình thót cổ đã nạp hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(6-bromo-4-metoxypyriđin-3-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (140 mg, 0,26 mmol), xesi cacbonat (172 mg, 0,53 mmol) và *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (68 mg, 0,40 mmol), và bình thót cổ phản ứng được làm bay hơi và được làm đầy lại bằng nitơ (3x). Bổ sung tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (24 mg, 0,030 mmol), và lại làm bay hơi và làm đầy lại bình thót cổ bằng nitơ (3x). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 4 giờ. Làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế gôm thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 30 đến 100% etyl axetat trong hexan để tạo ra hỗn hợp của *tert*-butyl 3-((5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-

3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-yl)amino)azetiđin-1-carboxylat và *tert*-butyl 3-(5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-ylamino)azetiđin-1-carboxylat (53 mg, 32%) dưới dạng màng khô. ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,50 - 0,68 (2H, m), 0,96 - 1,09 (2H, m), 1,12 (3H, d), 1,42 - 1,47 (9H, m), 1,60 - 1,88 (3H, m), 2,07 - 2,21 (2H, m), 2,50 - 2,67 (2H, m), 2,85 (1H, ddd), 3,10 - 3,23 (2H, m), 3,63 - 3,79 (4H, m), 3,87 - 3,91 (3H, m), 3,99 - 4,07 (1H, m), 4,24 - 4,33 (2H, m), 4,42 - 4,52 (1H, m), 5,36 (1H, d), 5,64 - 5,73 (1H, m), 5,83 (1H, d), 6,85 (1H, d), 7,26 - 7,32 (2H, m), 7,40 (1H, d), 8,00 - 8,03 (1H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 621.

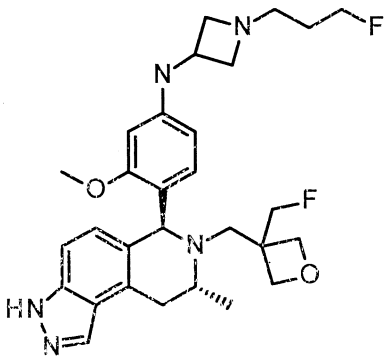
Điều chế *N*-(azetiđin-3-yl)-5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin



Bổ sung metanol (0,5 ml) vào bình thót cổ đã nạp *tert*-butyl 3-((5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-yl)amino)azetiđin-1-carboxylat (0,047 g, 0,080 mmol). Bổ sung HCl trong đioxan (4 M; 0,5 ml, 2 mmol), và tiếp tục khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng cách sử dụng hộp chứa SCX-2, rửa giải bằng amoniac 3N trong metanol, để tạo ra *N*-(azetiđin-3-yl)-5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin thô (25 mg, 76%) dưới dạng gôm. Sản phẩm được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. *m/z*: ES+ [M+H]+ 437.

Ví dụ 10

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

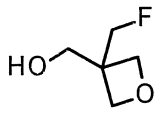


Bổ sung 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (47,3 mg, 0,36 mmol) trong 1,4-đioxan (1,4 ml) vào lọ vi sóng kín chứa (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (100 mg, 0,18 mmol), natri *tert*-butoxit (34,4 mg, 0,36 mmol) và [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′-biphenyl)]paladi(II) metansulfonat (BrettPhos Pd G3) (8,10 mg, 8,95 µmol). Khử khí lọ bằng cách tạo bọt khí nitơ trong thời gian 10 phút, sau đó gia nhiệt lên 90°C trong thời gian 1 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng EtOAc và rửa bằng nước. Chiết pha nước bằng EtOAc, sau đó làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp. Hòa tan phần cặn thô trong DCM (2 ml) và bổ sung TFA (1 ml). Khuấy hỗn hợp trong thời gian 1 giờ, sau đó làm bay hơi. Hòa tan phần cặn trong DCM và rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Chiết lớp nước bằng DCM, sau đó làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4 và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, silic oxit 5µ, đường kính 19 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa NH_3 0,1%) và MeCN làm chất rửa giải. Làm bay hơi các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn đến khô để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (59,0 mg, 63%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,07 (3H, d), 1,68 - 1,87 (2H, m), 2,62 (2H, t), 2,75 (1H,

d), 2,83 (1H, dd), 2,87 - 2,96 (3H, m), 3,10 (1H, dd), 3,27 (1H, dt), 3,74 (2H, q), 3,84 (3H, s), 4,04 - 4,14 (2H, m), 4,43 (4H, td), 4,53 (1H, t), 4,58 (1H, d), 4,78 (2H, td), 5,11 (1H, s), 5,90 (1H, dd), 6,12 (1H, d), 6,48 (1H, d), 6,80 (1H, d), 7,15 (1H, d), 8,05 (1H, d); *m/z*: ES+ [M+H]+ 526.

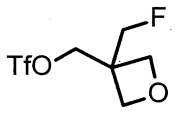
Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin như sau:

Điều chế (3-(flometyl)oxetan-3-yl)metanol



Bổ sung xesi florua (5,03 g, 33,14 mmol) vào bình thót cổ chứa (3-(bromometyl)oxetan-3-yl)metanol (2,00 g, 11,05 mmol) trong etylen glycol (6 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 150°C trong thời gian 2 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng EtOAc (30 ml) và nước (30 ml). Chiết lớp nước bằng đietyl ete (3 x 30 ml) và etyl axetat (3 x 30 ml). Làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 100% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được (3-(flometyl)oxetan-3-yl)metanol (0,734 g, 55%) dưới dạng dịch lỏng không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 3,92 (2H, s), 4,52 (4H, t), 4,59 - 4,89 (2H, m).

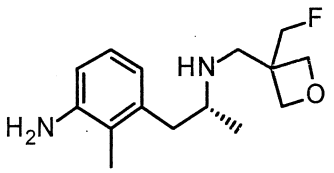
Điều chế (3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl triflometansulfonat



Bổ sung triflometansulfonic anhyđrit (1,47 ml, 8,74 mmol), sau đó là 2,6-đimetylpyriđin (1,12 ml, 9,57 mmol) vào dung dịch của (3-(flometyl)oxetan-3-yl)metanol (1,00 g, 8,32 mmol) trong DCM (30,7 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1 giờ. Rửa phản ứng bằng nước và dung dịch axit xitric 1N, sau đó làm khô trên Na_2SO_4, lọc và làm bay hơi để thu được (3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl triflometansulfonat (1,98 g, 94%) dưới dạng dầu màu đỏ, mà được sử dụng trực tiếp mà không tinh chế thêm. ^{1}H NMR (500 MHz,

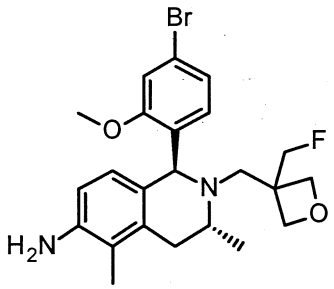
$CDCl_3$, 27°C) 4,40 – 4,75 (8H, m).

Điều chế (*R*)-3-(2-(((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin



Bổ sung (3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl triflometansulfonat (1,92 g, 7,61 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (1,00 g, 6,09 mmol) và DIPEA (1,58 ml, 9,13 mmol) trong 1,4-đioxan (18,7 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 70°C trong thời gian 5 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng EtOAc và rửa bằng nước. Chiết pha nước bằng EtOAc, sau đó làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 10% MeOH trong EtOAc. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (*R*)-3-(2-(((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (0,673 g, 42%) dưới dạng gôm màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,11 (3H, d), 2,04 (3H, s), 2,59 - 2,71 (1H, m), 2,76 - 3,10 (4H, m), 4,34 - 4,52 (4H, m), 4,53 - 4,68 (2H, m), 6,58 (1H, d), 6,60 (1H, d), 6,95 (1H, t). *m/z*: ES+ [M+H]+ 267.

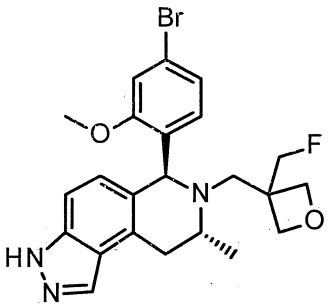
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 4-bromo-2-metoxybenzalđehyt (645 mg, 3,00 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-(((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (400 mg, 1,5 mmol) trong axit axetic (7,4 ml) và nước (135 µl, 7,50 mmol). Gia nhiệt phản ứng đến 80°C trong thời gian 4 giờ. Sau khi để nguội, làm bay hơi axit axetic, sau đó hòa tan phần cặn trong DCM và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4, lọc và làm bay hơi. Hòa tan phần cặn

trong metanol (5 ml), sau đó bổ sung hyđroxylamin hyđroclorua (313 mg, 4,50 mmol) và kali axetat (588 mg, 6,00 mmol) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Làm bay hơi các chất dễ bay hơi, sau đó hòa tan phần cặn trong DCM và nước. Các lớp được tách riêng, sau đó chiết lớp nước bằng DCM. Làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc và làm bay hơi, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (302 mg, 43%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,01 (3H, d), 2,07 (3H, s), 2,45 (1H, dd), 2,61 - 2,73 (1H, m), 2,86 (1H, d), 3,01 - 3,14 (1H, m), 3,54 (2H, s), 3,87 (3H, s), 4,41 - 4,48 (2H, m), 4,51 (1H, d), 4,53 - 4,60 (2H, m), 4,67 (1H, d), 4,73 - 4,81 (1H, m), 5,00 (1H, s), 6,47 (1H, s), 6,47 (1H, s), 6,61 (1H, d), 6,88 (1H, dd), 7,01 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 463.

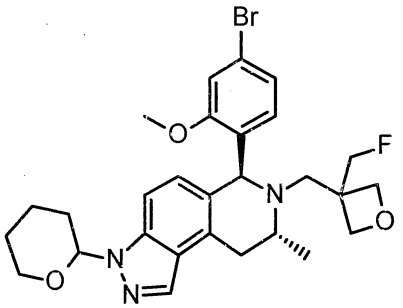
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung natri nitrit (39,1 mg, 0,57 mmol) trong nước (0,5 ml) vào dung dịch nguội của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (250 mg, 0,54 mmol) trong axit propionic (2,2 ml) ở nhiệt độ -15°C (bể nước đá khô/axeton). Sau khi khuấy trong thời gian 30 phút, bổ sung toluen lạnh như nước đá (15 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 0 °C trong thời gian 15 phút và sau đó để ấm lên nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Bổ sung nước (15 ml) và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x 15 ml), sau đó rửa các chất hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên Na_2SO_4, lọc và làm bay hơi.

Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 50% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (188 mg, 74%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,07 (3H, d), 2,70 (1H, d), 2,87 (1H, dd), 2,97 (1H, d), 3,11 - 3,18 (1H, m), 3,18 - 3,27 (1H, m), 3,90 (3H, s), 4,42 - 4,52 (3H, m), 4,59 (1H, d), 4,63 - 4,87 (2H, m), 5,19 (1H, s), 6,63 (1H, d), 6,76 (1H, d), 6,88 (1H, dd), 7,05 (1H, d), 7,19 (1H, d), 8,09 (1H, d). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 474.

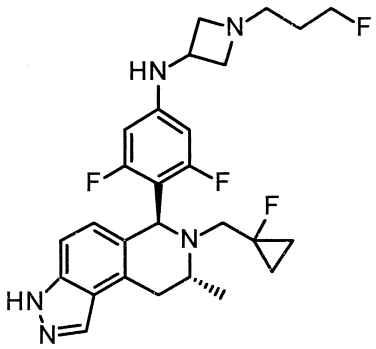
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7.8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2H-pyran (67,3 µl, 0,74 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (175 mg, 0,37 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (14,0 mg, 0,07 mmol) trong DCM (3,6 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 2 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, làm khô trên Na_2SO_4, lọc và làm bay hơi. Cho phần cặn đi qua nút silic oxit, rửa giải bằng EtOAc/heptan (1:1). Làm bay hơi dịch lọc để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (196 mg, 95%) dưới dạng chất rắn màu be, mà được sử dụng trực tiếp trong giai đoạn tiếp theo. *m/z*: ES+ [M+H]+ 558.

Ví dụ 11

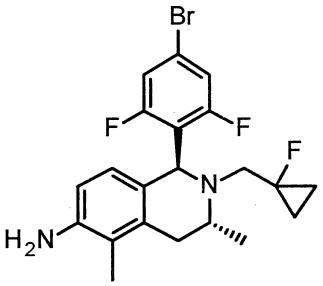
N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung HCl 4N trong đioxan (0,25 ml, 0,99 mmol) vào dung dịch của *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (58 mg, 0,10 mmol) trong metanol (0,30 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Làm bay hơi các chất dễ bay hơi và tạo huyền phù phần cặn trong $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (30 ml) và chiết bằng DCM (x2). Làm khô pha hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi. Tinh chế phần cặn thô bằng sắc ký silicagel và rửa giải bằng cách sử dụng građien từ 0 đến 10% NH_3/MeOH 1M trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (45,4 mg, 91%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3, 27°C) 0,47 (2H, dtd), 0,95 (2H, dt), 1,08 (3H, d), 1,68 - 1,85 (2H, m), 2,59 (2H, s), 2,69 (1H, dd), 2,91 (3H, dq), 3,14 (1H, dd), 3,43 (1H, dd), 3,69 (2H, q), 3,81 (1H, dd), 4,01 (1H, q), 4,28 (1H, d), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,19 (1H, s), 5,96 (2H, d), 6,82 (1H, d), 7,15 (1H, d), 8,06 (1H, d), 10,36 (1H, s). m/z (ES+), $[M+H]^+ = 502$.

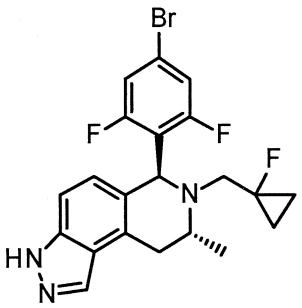
Điều chế *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin như sau:

Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Gia nhiệt (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (0,35g, 1,48 mmol) và 4-bromo-2,6-điflobenzalđehyt (0,33 g, 1,48 mmol) trong hỗn hợp của H_2O (0,13 ml, 7,40 mmol) và axit axetic (5,79 ml) ở nhiệt độ 80 °C trong thời gian 7 giờ. Làm bay hơi dung môi và xử lý phần cặn bằng HCl (1N, 10 ml) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Bổ sung vào phản ứng Na_2CO_3 rắn đến khi độ pH phản ứng >8. Pha loãng hỗn hợp bằng H_2O (40 ml) và chiết hai lần bằng EtOAc (2x50 ml). Làm khô pha hữu cơ trên $MgSO_4$, lọc, cô và tinh chế bằng sắc ký silic oxit (từ 10 đến 70% EtOAc trong heptan) để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,285 g, 44%) dưới dạng gôm màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,44 (2H, dq), 0,91 - 0,95 (1H, m), 0,95 - 0,99 (1H, m), 1,02 (3H, d), 2,06 (3H, s), 2,50 - 2,65 (2H, m), 3,00 - 3,15 (2H, m), 3,50 (2H, s), 3,69 (1H, d), 5,17 (1H, s), 6,42 (2H, s), 6,97 (1H, d), 6,99 (1H, d). m/z (ES+), [M+H]+ = 439.

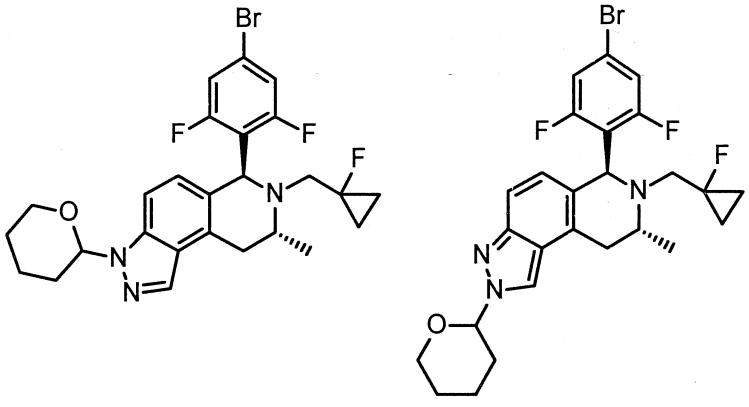
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Làm lạnh (1*S*,3*R*)-1-(4-Bromo-2,6-điflophenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,280 g, 0,64 mmol) trong axit propionic (2,66 ml) xuống -17°C (bể nước đá lạnh/axeton). Bổ sung từng giọt natri nitrit (0,044 g, 0,64 mmol) trong nước (0,53 ml) và khuấy

hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -17°C trong thời gian 30 phút. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng toluen lạnh như nước đá (15 ml) và khuấy ở nhiệt độ 4 °C trong thời gian 15 phút. Sau đó khuấy hỗn hợp và để ấm lên nhiệt độ trong phòng trong thời gian 45 phút. Rửa hỗn hợp phản ứng bằng nước (2 x 15 ml), rửa các pha nước kết hợp bằng EtOAc (2 x 10 ml), rửa các chất hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước (1 x 20 ml), làm khô ($MgSO_4$), lọc và dịch lọc làm bay hơi để thu được dầu màu nâu-da cam. Tinh chế nguyên liệu thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải 0-40% EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,216 g, 75%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,46 (2H, dddd), 0,91 - 1,04 (2H, m), 1,07 (3H, d), 2,66 (1H, dd), 2,95 (1H, dd), 3,15 (1H, dd), 3,46 (1H, dd), 3,83 (1H, dd), 5,32 (1H, s), 6,76 (1H, d), 7,00 (2H, d), 7,18 (1H, d), 8,09 (1H, d), 10,52 (1H, s). m/z (ES+), [M+H]+ = 450.

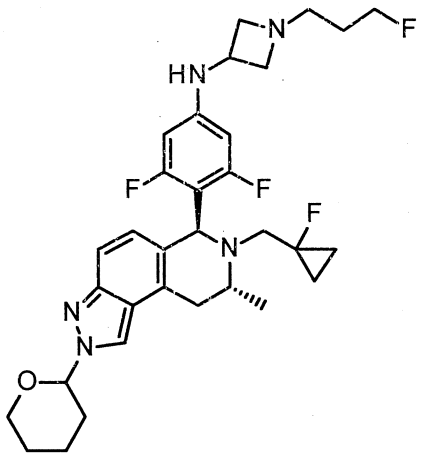
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Nạp vào lọ vi sóng (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (216 mg, 0,48 mmol), axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (9,1 mg, 0,05 mmol), 3,4-đihyđro-2H-pyran (0,07 ml, 0,72 mmol) và DCM (2 ml). Gia nhiệt hỗn hợp trong vi sóng ở nhiệt độ 80 °C trong thời gian 20 phút. Bổ sung lượng khác nữa

(0,035 ml, 0,36 mmol) của 3,4-đihyđro-2H-pyran và gia nhiệt phản ứng lên 85 °C trong 15 phút nữa. Pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, sau đó Làm khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4, lọc và cô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 50% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được hai sản phẩm được bảo vệ bằng THP ở dạng chất đồng phân regioisome (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (237 mg, 92%) dưới dạng gôm màu vàng nhạt (dữ liệu đối với chất đồng phân chính được nêu). ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,35 - 0,55 (2H, m), 0,96 (2H, ddd), 1,05 (3H, dd), 1,58 - 1,84 (3H, m), 1,97 - 2,32 (3H, m), 2,64 (1H, dd), 2,77 (1H, dd), 3,14 (1H, ddd), 3,29 - 3,54 (1H, m), 3,62 - 3,91 (2H, m), 3,96 - 4,25 (1H, m), 5,26 (1H, d), 5,65 (1H, ddd), 6,64 (1H, d), 7,00 (2H, d), 7,26 - 7,45 (1H, m), 8,13 (1H, dd). m/z (ES+), $[M+H]^+$ = 534.

Điều chế *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

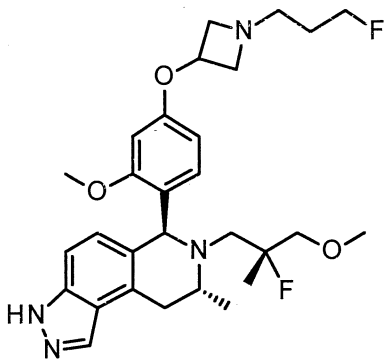


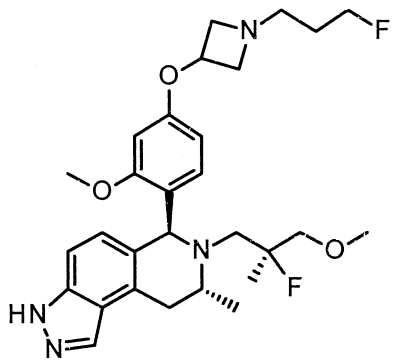
Bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′-biphenyl)]palađi(II) metansulfonat (BrettPhos Pd G3) (5,0 mg, 5,54 µmol) vào huyền phù của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-

6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (37 mg, 0,07 mmol), 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (22,9 mg, 0,17 mmol) và natri *tert*-butoxit (13,3 mg, 0,14 mmol) trong 1,4-đioxan đã khử khí (0,58 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 95°C trong thời gian 1,5 giờ trong vi sóng. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc, lọc qua xelit và làm bay hơi đến khô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 10% NH_3/MeOH 1M trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được *N*-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (18,0 mg, 44%) dưới dạng màng khô không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,38 - 0,54 (2H, m), 0,94 (2H, ddd), 1,06 (3H, dd), 1,67 - 1,82 (4H, m), 2,04 - 2,25 (4H, m), 2,59 (2H, t), 2,63 - 2,77 (2H, m), 2,89 (2H, dd), 3,14 (1H, s), 3,29 - 3,37 (1H, m), 3,70 (2H, q), 3,75 - 3,81 (2H, m), 4,00 (1H, q), 4,12 - 4,17 (1H, m), 4,22 (1H, d), 4,43 (1H, t), 4,52 (1H, t), 5,10 (1H, s), 5,55 - 5,74 (1H, m), 5,96 (2H, d), 6,71 (1H, d), 7,28 - 7,44 (1H, m), 8,10 (1H, dd). m/z (ES+), [M+H]+ = 586.

Các ví dụ 12 & 13

Điều chế các chất đồng phân lập thể không đối quang riêng lẻ của (6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-6-(4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin





Bổ sung DMF (0,66 ml) sau đó là DIPEA (23,9 µl, 0,14 mmol) vào bình thót cổ đã nạp (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

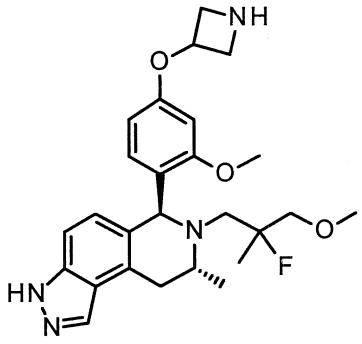
(32 mg, 0,07 mmol). Phun từng giọt 1-flo-3-iođopropan (13,5 mg, 0,07 mmol) vào phản ứng có khuấy và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Làm bay hơi phản ứng đến khô và tinh chế phần cặn bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 10% NH_3/MeOH 1M trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được sản phẩm dưới dạng hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang. Các chất đồng phân lập thể không đối quang được tách riêng bằng SFC điều chế bất đối xứng (cột Phenomonex Lux C4, silic oxit 5µ, đường kính 30 mm, chiều dài 250 mm), bằng cách sử dụng 40% MeOH + 0,1% NH_3 đẳng dòng giảm dần trong CO_2 làm chất rửa giải để thu được chất đồng phân rửa giải thứ nhất (8,0 mg, 22%) và chất đồng phân rửa giải thứ hai (8,0 mg, 22%) dưới dạng màng khô màu vàng nhạt.

Chất đồng phân 1: ^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3, 27°C) 1,06 (3H, d), 1,28 (3H, d), 1,72 - 1,83 (2H, m), 2,47 (1H, dd), 2,63 (2H, t), 2,8 - 2,95 (2H, m), 3,03 - 3,11 (2H, m), 3,19 (2H, s), 3,33 (3H, s), 3,56 (1H, dd), 3,67 (1H, d), 3,79 (2H, q), 3,86 (3H, s), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,74 (1H, t), 5,32 (1H, s), 6,10 (1H, dd), 6,41 (1H, d), 6,69 (1H, d), 6,76 (1H, d), 7,13 (1H, d), 8,05 (1H, d), 10,20 (1H, s). m/z (ES+), [M+H]+ = 529;

Chất đồng phân 2: ^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3, 27°C) 1,06 (3H, d), 1,25 (3H, d), 1,70 - 1,82 (2H, m), 2,45 - 2,56 (1H, m), 2,63 (2H, t), 2,78 - 2,91 (2H, m), 3,02 - 3,11 (2H, m), 3,18 (1H, d), 3,36 (3H, s), 3,42 (1H, dd), 3,47 - 3,55 (1H, m), 3,62 (1H, d), 3,74 - 3,82 (2H, m), 3,86 (3H, s), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,73 (1H, t), 5,36 (1H, s), 6,08 (1H, dd), 6,41 (1H, d), 6,67 (1H, d), 6,79 (1H, d), 7,15 (1H, d), 8,06 (1H, d), 10,20 (1H, s). m/z (ES+), [M+H]+ = 529.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin như sau:

Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

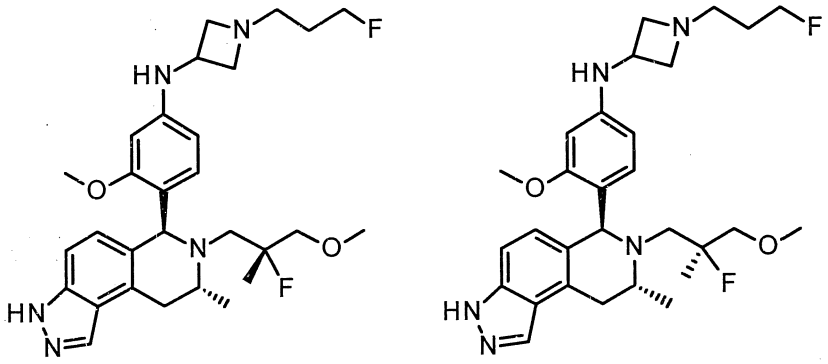


Tert-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat (102 mg, 0,59 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (110 mg, 0,20 mmol), *tert*-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat (102 mg, 0,59 mmol), Pd RockPhos thế hệ thứ 3 (16,6 mg, 0,02 mmol) và xesi cacbonat (128 mg, 0,39 mmol) được tạo huyền phù trong toluen (1,26 ml) và giữ kín trong ống vi sóng. Gia nhiệt phản ứng đến 95°C trong thời gian 20 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (25 ml) và lọc qua xelit. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 100% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm không tinh khiết đến khô và hòa tan trong DCM (1,3 ml) mà TFA (378 µl, 4,91 mmol) được bổ sung từng giọt vào đó. Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ, sau đó loại bỏ các chất dễ bay hơi trong chân không. Rửa phần cặn bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (30 ml) và chiết bằng DCM (2x 30 ml). Làm khô pha hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 40% NH_3/MeOH 1M trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (35,0 mg, 38%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,06 (3H, dd), 1,24 - 1,35 (3H, m), 2,49 (1H, dt), 2,76 - 2,96 (2H, m), 3,08 - 3,27 (2H, m), 3,34 (3H, d), 3,41 (1H, s), 3,53 - 3,69 (2H, m), 3,69 - 3,93 (7H, m), 4,81 - 5,08 (1H, m), 5,34 (1H, d), 6,02 - 6,12 (1H, m), 6,40 (1H, t), 6,68 (1H, s), 6,77 (1H, dd), 7,13 (1H, d), 8,05 (1H, t). m/z (ES+), [M+H]+ = 469.

Các ví dụ 14 & 15

Điều chế các chất đồng phân lập thể không đối quang riêng lẻ của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-

7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



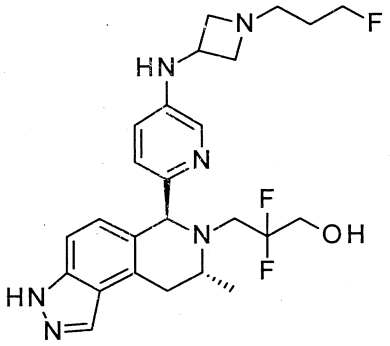
Tạo huyền phù 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (175 mg, 1,32 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (370 mg, 0,66 mmol) và natri *tert*-butoxit (127 mg, 1,32 mmol) trong 1,4-đioxan (8 ml). Khử khí hỗn hợp và bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′- triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′ -biphenyl)]paladi(II) metansulfonat metansulfonat (Brett Phos G3) (60 mg, 0,07 mmol). Gia nhiệt phản ứng đến 100°C trong thời gian 3 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (100 ml) và rửa bằng nước (100 ml). Làm bay hơi lớp hữu cơ. Quy trình này được lặp lại bằng cách sử dụng 114 mg (0,3 mmol) của aryl bromua. Các sản phẩm thô kết hợp từ các phản ứng này được tạo huyền phù trong axit clohyđric (2M, 5 ml) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước (10 ml) và rửa bằng EtOAc (10 ml). Bazơ hóa pha nước bằng natri hyđroxit 2M trong nước và chiết bằng DCM (2 x 15 ml). Làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn đến khô để thu được sản phẩm thô dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang mà được tách riêng bằng SFC điều chế bất đối xứng (cột Phenomonex Lux C4, silic oxit 5µ, đường kính 30 mm, chiều dài 250 mm), bằng cách sử dụng 40% MeOH + 0,1% NH_3 đẳng dòng giảm dần trong CO_2 làm chất rửa giải để thu được chất đồng phân rửa giải thứ nhất (42 mg, 19%) và chất đồng phân rửa giải thứ hai (29 mg, 13%)

Chất đồng phân 1: ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,96 (3H, d), 1,20 (3H, d), 2,36 - 2,44 (1H, m), 2,65 - 2,85 (3H, m), 2,92 (4H, q), 3,05 - 3,22 (3H, m), 3,23 (3H, s), 3,24 - 3,27 (2H, m), 3,46 - 3,59 (2H, m), 3,78 (3H, s), 4,49 (2H, dd), 5,16 (1H, s), 5,35 (1H, t), 5,95 (1H, dd), 6,23 (1H, d), 6,36 (1H, d), 6,63 (1H, d), 7,16 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,90 (1H, s); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -219,77, -149,11, m/z: ES+ [M+H]+ 528.

Chất đồng phân 2: ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,97 (3H, d), 1,19 (3H, d), 2,68 - 2,81 (3H, m), 2,88 - 2,95 (3H, m), 3,05 - 3,11 (1H, m), 3,21 - 3,28 (5H, m), 3,32 - 3,39 (1H, m), 3,43 - 3,56 (2H, m), 3,79 (3H, s), 4,49 (2H, dd), 5,17 (1H, s), 5,34 (1H, t), 5,93 (1H, dd), 6,23 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,64 (1H, d), 7,16 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,90 (1H, s); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -219,76, -148,20; m/z: ES+ [M+H]+ 528.

Ví dụ 16

Điều chế 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol

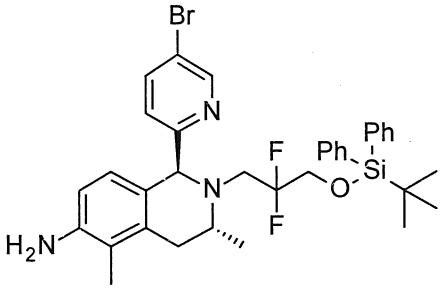


Bổ sung axit clohyđric (2,0 M, 0,5 ml) vào 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol (0,132 g, 0,23 mmol) và khuấy dung dịch ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ. Tinh chế hỗn hợp phản ứng bằng sắc ký trao đổi ion, bằng cách sử dụng cột SCX. Rửa giải sản phẩm mong muốn từ cột bằng cách sử dụng NH_3/MeOH 1M để thu được 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol (0,084 g, 75%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,04 (3H, d), 1,20 - 1,28 (2H, m) 1,59 - 1,71 (2H, m), 2,60 - 2,70 (1H, m), 2,73 - 2,84

(3H, m), 2,99 (1H, dd), 3,08 - 3,18 (1H, m), 3,41 (1H, d), 3,61 - 3,72 (4H, m), 3,93 (1H, d), 4,44 (2H, dt), 4,94 (1H, s), 5,42 (1H, t), 6,21 (1H, d), 6,78 - 6,82 (2H, m), 6,90 (1H, d), 7,21 (1H, d), 7,74 (1H, d), 8,03 (1H, s), 12,94 (1H, s); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -218,24, -108,31; m/z: ES+ [M+H]+ 489.

Điều chế 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol như sau:

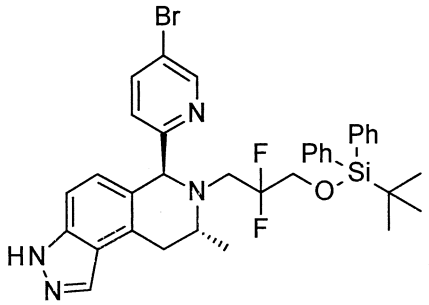
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Gia nhiệt (*R*)-3-(2-((3-((Tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,20 g, 2,42 mmol) và 5-bromopicolinalđehyt (0,944 g, 5,07 mmol) trong axit axetic (12 ml) và nước (0,22 ml, 12,08 mmol) đến 70 °C trong thời gian 30 phút. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng và tái hòa tan phần cặn trong etanol (10 ml). Bổ sung kali axetat (0,594 g, 6,05 mmol) và hyđroxylamin hyđroclorua (0,252 g, 3,63 mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút sau đó làm bay hơi và phần cặn phân chia giữa DCM (30 ml) và natri bicacbonat bão hòa trong nước (30 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,090 g, 68%) dưới dạng gôm không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,96 (9H, s), 0,98 (3H, d), 1,94 (3H, s), 2,40 (1H, dd), 2,57 (1H, dd), 2,66 - 2,78 (1H, m), 3,11 - 3,22 (2H, m), 3,84 - 3,93 (1H, m), 3,95 - 4,05 (1H, m), 4,69 (2H, s), 4,91 (1H, s), 6,39 (1H, d), 6,42 (1H, d), 6,99 (1H, d), 7,39 - 7,48 (6H, m), 7,59 (4H, ddd), 7,80 (1H, dd), 8,51 (1H, dd); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -109,84 (d), -108,39 (d); m/z: ES+

[M+H]+ 664/666.

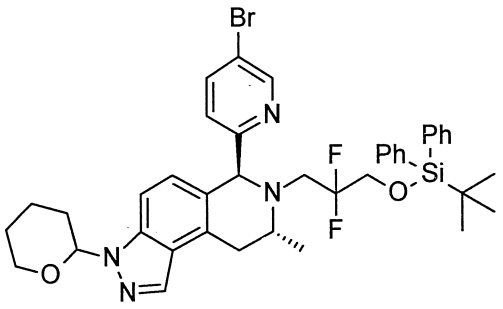
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung natri nitrit (119 mg, 1,72 mmol) trong nước (1,0 ml) vào dung dịch đã được làm lạnh bằng nước đá của (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,09 g, 1,64 mmol) và axit para-toluensulfonic hyđrat (0,94 g, 4,92 mmol) trong axetonitril (6 ml). Khuấy phản ứng trong thời gian 15 phút và sau đó để ấm lên nhiệt độ trong phòng trong thời gian 45 phút. Sau khi để nguội trở lại 4 °C, bổ sung tetrabutylamoni axetat (2,54 g, 8,20 mmol) trong MeCN lạnh như nước đá (40 ml) và khuấy phản ứng trong thời gian 15 phút trước khi ấm lên đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút nữa, bổ sung EtOAc (120 ml) sau đó là NaOH 2 M (100 ml). Rửa pha hữu cơ bằng natri clorua bão hòa trong nước, làm khô (Na_2SO_4) và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,330 g, 30%) dưới dạng bọt màu nâu sáng. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,97 (9H, s), 1,06 (3H, d), 2,75 - 2,91 (2H, m), 2,99 - 3,06 (1H, m), 3,34 - 3,41 (2H, m), 3,88 - 4,01 (2H, m), 5,12 (1H, s), 6,83 (1H, d), 7,12 (1H, d), 7,26 (1H, d), 7,39 - 7,45 (4H, m), 7,46 - 7,50 (2H, m), 7,56 - 7,62 (4H, m), 7,85 (1H, dd), 8,07 - 8,09 (1H, m), 8,54 (1H, dd), 13,02 (1H, s); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -110,01 (d), -108,72 (d); m/z: ES+ [M+H]+ 675/677.

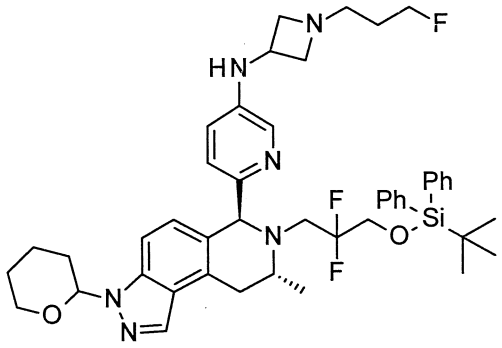
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-

3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung axit para toluensulfonic hyđrat (93 mg, 0,49 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,330 g, 0,49 mmol) và 3,4-đihyđro-2H-pyran (0,13 ml, 1,47 mmol) trong DCM (5 ml) và gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (20 ml) và rửa bằng natri bicarbarbonat bão hòa trong nước(20 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ để thu được dầu màu nâu sẫm và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50 % EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-((S)-tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,330 g, 89%) dưới dạng gôm. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -110,03 (d), -108,83 (d), -108,79 (d); m/z: ES+ [M+H]+ 759/761.

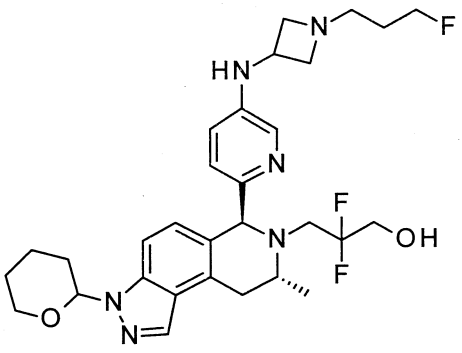
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của 6-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin



Tạo huyền phù 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,115 g, 0,87 mmol),

(6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,330 g, 0,43 mmol), đixyclohexyl(2',4',6'-triisopropyl-3,6-đimetoxy-[1,1'-biphenyl]-2-yl)phosphane (0,023 g, 0,04 mmol) và natri *tert*-butoxit (0,125 g, 1,30 mmol) trong 1,4-đioxan (4 ml). Khử khí hỗn hợp và bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′- triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′-biphenyl)]paladi(II) metansulfonat metansulfonat (BrettPhos G3) (0,039 g, 0,04 mmol). Gia nhiệt phản ứng đến 100°C trong thời gian 3 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (50 ml) và rửa bằng nước (50 ml). Làm bay hơi lớp hữu cơ và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong DCM để thu được 6-((6*S*,8*R*)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (0,264 g, 75%) dưới dạng gôm màu vàng dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -218,19, -110,13, -109,44, -108,6 -107,8; *m/z*: ES+ [M+H]+ 811.

<u>Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol</u>

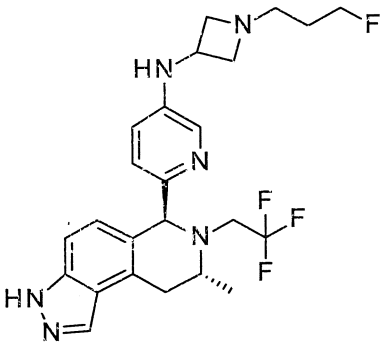


Bổ sung tetrabutylamoni florua (1,0 M trong THF, 0,5 ml, 0,50 mmol) vào dung dịch của 6-((6*S*,8*R*)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (0,264 g, 0,33 mmol) trong THF (2 ml). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong

thời gian 4 giờ và làm bay hơi hỗn hợp phản ứng và phần cặn phân chia giữa DCM (20 ml) và nước (20 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong DCM để thu được 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol (0,132 g, 71%) dưới dạng màng khô không màu dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể không đối quang. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -218,19, -108,42, -108,39; m/z: ES+ [M+H]+ 573.

Ví dụ 17

Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin

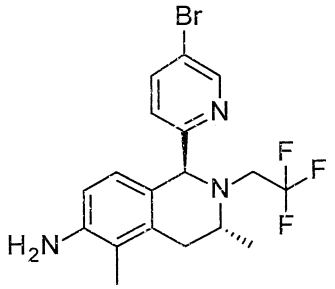


Tạo huyền phù 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (50 mg, 0,38 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,100 g, 0,20 mmol), xesi cacbonat (128 mg, 0,39 mmol) và [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′-biphenyl)]paladi(II) metansulfonat metansulfonat (Brett Phos G3) (23 mg, 0,02 mmol) trong 1,4-đioxan (2 ml) và giữ kín trong ống vi sóng. Gia nhiệt phản ứng lên 100°C trong thời gian 4 giờ dưới sự chiếu xạ vi sóng. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (20 ml) và rửa bằng nước (20 ml). Làm bay hơi lớp hữu cơ và hòa tan sản phẩm thô trong DCM (3 ml) và TFA (0,3 ml). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ sau đó hỗn hợp phản ứng được phân chia giữa DCM (20 ml) và NaOH 2M (20 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được *N*-(1-(3-

flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (9,0 mg, 10%) dưới dạng màng khô không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,70 - 1,82 (2H, m), 2,62 (2H, t), 2,85 (1H, dd), 2,93 - 3,06 (3H, m), 3,20 - 3,31 (2H, m), 3,59 (1H, td), 3,73 (2H, dt), 4,10 (2H, dd), 4,48 (2H, dt), 5,03 (1H, s), 6,80 (1H, dd), 6,89 (1H, d), 7,15 (1H, d), 7,21 (1H, d), 7,84 (1H, dd), 8,01 (1H, d); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -224,69, -75,55; *m/z*: ES+ [M+H]+ 477.

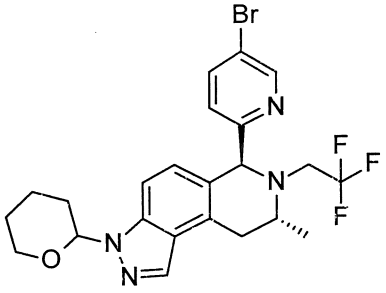
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin như sau.

Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Gia nhiệt (*R*)-2-Metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (0,290 g, 1,18 mmol) và 5-bromopicolinalđehyt (0,460 g, 2,47 mmol) trong axit axetic (6 ml) và nước (0,1 ml) lên 70°C trong thời gian 30 phút. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng và hòa tan phần cặn trong etanol (10 ml). Bổ sung kali axetat (0,290 g, 2,95 mmol) và hyđroxylamin hyđroclorua (0,123 g, 1,77 mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng và phần cặn được phân chia giữa DCM (30 ml) và natri bicacbonat bão hòa trong nước (30 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,264 g, 54%) dưới dạng màng khô không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,03 (3H, d), 1,94 (3H, s), 2,45 (1H, dd), 2,67 (1H, dd), 2,90 (1H, dd), 3,22 - 3,29 (1H, m), 3,49 (1H, dd), 4,69 (2H, s), 4,85 (1H, s), 6,40 - 6,46 (2H, m), 7,21 (1H, d), 7,95 (1H, dd), 8,56 (1H, dd); ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO, 27°C) -69,83; *m/z*: ES+ [M+H]+ 414/416.

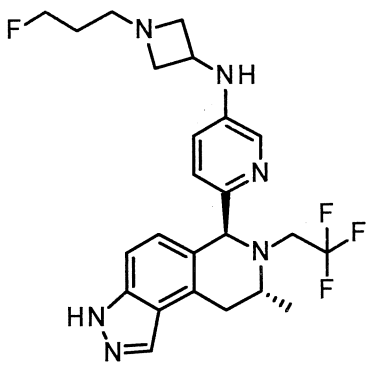
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung natri nitrit (0,048 g, 0,70 mmol) trong nước (0,2 ml) vào dung dịch nguội của (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,264 g, 0,64 mmol) trong axit propionic (2,5 ml) ở nhiệt độ -10°C. Khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ, sau đó bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (10 ml). Dập tắt phản ứng bằng cách bổ sung natri bicacbonat bão hòa trong nước (15 ml) và khuấy trong thời gian 15 phút trước khi để cho ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Làm khô pha hữu cơ (Na_2SO_4) và làm bay hơi để tạo ra (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,272 g, 0,64 mmol) thô dưới dạng gôm màu nâu. Hòa tan nguyên liệu trong DCM (10 ml) và bổ sung axit para toluensulfonic hyđrat (0,012 g, 0,06 mmol) và gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM (20 ml) và rửa bằng NaOH trong nước (2M, 30 ml). Làm bay hơi pha hữu cơ để tạo ra dầu màu nâu sẫm và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 40 % EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,142 g, 44%). *m/z*: ES+ [M+H]+ 509/511.

Cách thay thế #1 đối với Ví dụ 17:

Điều chế *N*-[1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl]-6-[(6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-3,6,8,9-tetrahyđropyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl]pyriđin-3-amin

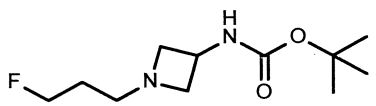


Bổ sung axit triflo axetic (1,30 l, 17,04 mol) vào dung dịch có khuấy của *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (0,50 Kg, 2,04 mol) trong DCM (1,50 l) ở nhiệt độ 0°C trong 0,5 giờ. Để cho hỗn hợp ấm lên đến 20°C và khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 2,5 giờ. Gia nhiệt hỗn hợp lên 30°C và tiếp tục khuấy trong thời gian 1 giờ. Cô hỗn hợp dưới áp suất giảm và cô phần cặn dưới áp suất giảm từ toluen (3 x 3,00 l). Hòa tan phần cặn thu được trong 1,4-đioxan (3,00 l) và xử lý bằng dung dịch natri 2-metylbutan-2-olat 30% trong Me-THF (5,50 l, 13,63 mol) trong 45 phút, đảm bảo nhiệt độ không vượt quá 29 °C. Bổ sung dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin 90% khối lượng/khối lượng (0,81 Kg, 1,70 mol) trong 1,4-đioxan (1,50 l) và BrettPhos Pd G3 (0,077 Kg, 0,085 mol) và thay thế không khí bằng nitơ bằng cách sử dụng các chu kỳ của chân không và nitơ (3 x). Gia nhiệt hỗn hợp lên 55°C và khuấy ở nhiệt độ 55°C trong 2,5 giờ. Làm nguội hỗn hợp xuống 21 °C và bổ sung dung dịch $NaHCO_3$ 8% trong nước (7,16 l, 6,82 mol), sau đó là isopropyl axetat (4,50 l). Khuấy hỗn hợp trong 2-3 phút và các lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng dung dịch $NaHCO_3$ 8% trong nước (7,16 l, 6,82 mol), khuấy hỗn hợp trong thời gian 5 phút và sau đó các lớp được tách riêng. Chiết các lớp nước kết hợp bằng isopropyl axetat (4,50 l). Xử lý các lớp hữu cơ kết hợp bằng Silicycle (SiliaMetS-Thiol, 400 g, 1,26 mmol/g, 6 đương lượng so với Pd) và khuấy hỗn hợp trong thời gian 16 giờ. Loại bỏ chất rắn bằng cách lọc qua xelit, rửa bánh lọc bằng isopropyl axetat. Cô dịch lọc dưới áp suất giảm (nhiệt độ bể 40°C). Hòa tan phần cặn trong ispropyl axetat (5,00 l) và xử lý bằng lượng khác nữa của Silicycle (SiliaMetS-Thiol, 250 g, 1,26 mmol/g, 3,7 đương lượng so với Pd). Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 21 °C trong thời

gian 16 giờ. Loại bỏ chất rắn bằng cách lọc qua xelit, rửa bánh lọc bằng isopropyl axetat (2,50 l). Cô dịch lọc dưới áp suất giảm (nhiệt độ bể 40°C) để tạo ra bọt màu nâu. Tinh chế sản phẩm thô bằng SFC điều chế (cột Lux C4, đường kính 50 mm, chiều dài 250 mm), bằng cách sử dụng sự rửa giải gradien của EtOH/DEA 100/0,5 trong CO_2, pha động 140 bar ở tốc độ dòng chảy bằng 400 ml/phút ở nhiệt độ 40°C) để tạo ra bọt rắn màu nâu sáng. Bổ sung EtOAc (2,00 l) và cô dung dịch dưới áp suất giảm. Bổ sung EtOAc (1,90 l) và heptan (1,90 l) và cấy hỗn hợp ở nhiệt độ 25°C. Giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 1 giờ. Bổ sung heptan (6,50 l) trong 2 giờ vào hỗn hợp có khuấy. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 22 °C trong thời gian 18 giờ. Thu gom chất rắn thu được bằng cách lọc, rửa bánh lọc bằng EtOAc/heptan 1:5 (2,50 l). Hút khô chất rắn dưới lớp phủ nitơ trong thời gian 30 phút, sau đó làm khô dưới chân không ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 9 ngày để tạo ra *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (626 g, 77%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,07 (3H d) 1,63 (2H, dquin), 2,45 (2H, t), 2,72 (2H, br t), 2,83 (1H, br dd), 2,91 - 3,00 (1H, m), 3,06 (1H, br dd) 3,42 - 3,55 (2H, m), 3,58-3,65 (2H, m), 3,92 (1H, dquin) 4,43 (2H, dt) 4,92 (1H, s), 6,22 (1H, d), 6,79 (1H, d) 6,82 (1H, dd), 6,96 (1H, d), 7,21 (1H, d), 7,73 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,96 (1H, s). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 477.

Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat và (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin được mô tả dưới đây.

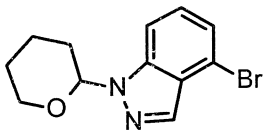
Điều chế *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat



Phản ứng được thực hiện trong hai bản sao và được kết hợp để thực hiện phản ứng phụ: Bổ sung 1-flo-3-iođo-propan (189 g, 1,00 mol) vào hỗn hợp có khuấy của tert-butyl *N*-(azetiđin-3-yl)carbamat;hyđroclorua (200 g, 0,96 mol) và K_2CO_3 (331 g, 2,40 mol) trong THF (1,40 l) và nước (0,50 mol) ở nhiệt độ 20°C.

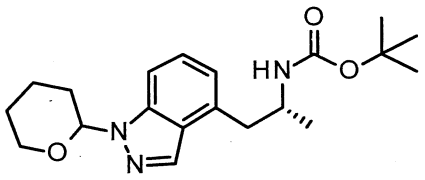
Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng lên 70°C và khuấy ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 1,5 giờ. Hai hỗn hợp phản ứng được kết hợp và được bổ sung vào nước (2,5 l) và EtOAc (2,0 l). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 21 °C trong 3 phút. Các lớp được tách riêng và rửa lớp hữu cơ bằng nước (2 x 2,0 l) và dung dịch amoni clorua bão hòa (2,0 l). Cô lớp hữu cơ dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Bổ sung toluen (400 ml) và gia nhiệt hỗn hợp lên 60°C. Bổ sung heptan (1,6 l) và để cho hỗn hợp nguội xuống 21 °C và khuấy trong thời gian 15 phút. Thu gom chất rắn bằng cách lọc và hút khô để tạo ra tert-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (230 g, 52%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,44 (9H, s), 1,68 - 1,80 (2H, m), 2,56 (2H, t), 2,87 (2H, s), 3,66 (2H, t), 4,29 (1H, s), 4,43 (1H, t), 4,52 (1H, t), 4,86 (1H, s).

Điều chế 4-bromo-1-tetrahyđropyran-2-yl-inđazol



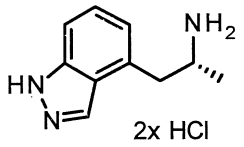
Bổ sung axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (11,60 g, 0,06 mol) vào bột nhão của 4-bromo-1H-inđazol (1,50 Kg, 7,60 mol) và 3,4-đihyđro-2H-pyran (0,96 Kg, 11,40 mol) trong DCM (2,40 l) ở nhiệt độ 20°C dưới nitơ. Khuấy bột nhão thu được ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 29 °C (tỏa nhiệt ít) trong thời gian 110 phút. Rửa dung dịch thu được bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, (2,00 l), và làm bay hơi lớp hữu cơ dưới áp suất giảm. Bổ sung heptan nóng (70°C) (2,50 l) và làm bay hơi hỗn hợp dưới áp suất giảm để tạo ra chất rắn kết tinh. Thực hiện tinh chế bằng cách tái kết tinh từ heptan nóng (70°C) (7,00 l) cho phép dung dịch nguội từ từ xuống 34 °C. Thu gom chất rắn thu được bằng cách lọc và rửa bằng heptan lạnh để tạo ra 4-bromo-1-tetrahyđropyran-2-yl-inđazol (1,87 Kg, 87%) dưới dạng chất rắn kết tinh. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,54 - 1,66 (2H, m), 1,67 - 1,85 (1H, m), 1,94 - 2,09 (2H, m), 2,31 - 2,45 (1H, m), 3,70 - 3,81 (1H, m), 3,83 - 3,97 (1H, m), 5,88 (1H, dd), 7,32 - 7,39 (1H, m), 7,40 - 7,44 (1H, m), 7,79 (1H, dt), 8,09 (1H, d) *m/z*: ES- $[M-H]^-$ 282.

Điều chế *tert*-butyl *N*-[(1*R*)-1-metyl-2-(1-tetrahyđropyran-2-ylinđazol-4-yl)etyl]carbamat



Làm lạnh từ từ dung dịch của 4-bromo-1-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-1H-inđazol (0,70 Kg, 2,49 mol) trong THF (3,50 l) trong gia lượng 10°C xuống -70°C. Bổ sung butyllithi 2,5 M trong hexan (1,10 l, 2,74 mol) trong 70 phút, giữ nhiệt độ bên trong dưới -60°C. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ -72 °C trong thời gian 1 giờ. Bổ sung hexyllithi 2,3 M trong hexan (0,054 l, 0,12 mol), sau đó là dung dịch của tert-butyl (*R*)-4-metyl-1,2,3-oxathiazoliđin-3-carboxylat 2,2-đioxit (652 g, 2,74 mol) trong THF (2,80 l) trong 2 giờ, đảm bảo nhiệt độ bên trong không vượt quá -58°C. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ -60°C trong thời gian 16 giờ. Để hỗn hợp từ từ ấm lên -10°C trong 1,5 giờ. Bổ sung cẩn thận nước (2,10 l). Các lớp được tách riêng và rửa lớp hữu cơ bằng nước muối bão hòa (1,40 l) và cô lớp hữu cơ dưới áp suất giảm để tạo ra dầu. Bổ sung IPA (1,50 l) và cô hỗn hợp dưới áp suất giảm để tạo ra tert-butyl ((2*R*)-1-(1-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat (1,27 Kg, >100%) dưới dạng dầu màu nâu. Lấy nó mà không tinh chế thêm. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,08 (3H, dd), 1,43 (9H, s), 1,63 - 1,69 (1H, m), 1,73 - 1,82 (2H, m), 2,07 (1H, dd), 2,17 (1H, dd), 2,53 - 2,64 (1H, m), 2,95 (1H, s), 3,21 (1H, dt), 3,70 - 3,80 (1H, m), 3,97 - 4,12 (2H, m), 4,33 - 4,49 (1H, m), 5,71 (1H, ddd), 6,96 (1H, dd), 7,31 (1H, ddd), 7,46 (1H, d), 8,13 (1H, s). *m/z*: ES+ [M·+] 359

Điều chế (2*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin.đihyđroclorua

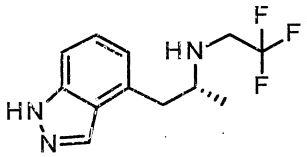


Bổ sung HCl 12 M (1,00 l, 12,0 mol) trong 20 phút vào dung dịch có khuấy của *tert*-butyl((2*R*)-1-(1-(tetrahyđro-2H-pyran-2-yl)-1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat (1,27 Kg, 1,76 mol) trong IPA (1,50 l), giữ nhiệt độ bên trong dưới 30°C. Gia nhiệt hỗn hợp thu được lên 40°C và khuấy ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 16 giờ. Tăng nhiệt độ lên 55°C và bổ sung phần khác nữa của HCl 12 M (0,20 l, 2,40 mol) và tiếp tục khuấy trong thời gian 7 giờ. Bổ sung MTBE

(2,50 l) và để hỗn hợp có khuấy ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 16 giờ. Thu gom chất rắn thu được bằng cách lọc và rửa bánh lọc bằng IPA 10% trong MTBE (2,00 l). Làm khô chất rắn thu được dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 72 giờ để tạo ra (2*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin;đihyđroclorua (0,39 Kg, 89%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ.

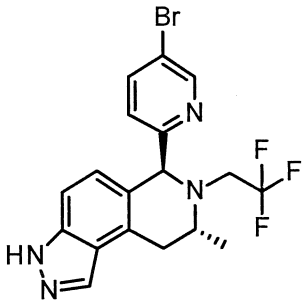
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,12 (3H, d), 2,96 (1H, dd), 3,39 (1H, dd), 3,45 - 3,55 (1H, m), 6,94 (1H, d), 7,28 (1H, dd), 7,43 (1H, d), 8,23 (3H, s), 8,28 (1H, d). *m/z*: ES+ [M·+] 175.

Điều chế (2*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin



Bổ sung dung dịch của 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (0,73 Kg, 2,94 mol) trong MeCN (2,00 l) vào hỗn hợp có khuấy của (*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin đihyđroclorua (0,77 Kg, 2,94 mol) và K_2CO_3 (1,26 Kg, 9,13 mol) trong MeCN (8,00 l) ở nhiệt độ 25°C dưới nitơ. Gia nhiệt hỗn hợp thu được lên 60°C và khuấy ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 18 giờ. Bổ sung MeCN (5,00 l) và loại bỏ chất rắn bằng cách lọc. Cô dịch lọc dưới áp suất giảm và hòa tan chất rắn thu được trong EtOAc (10,00 l), rửa bằng nước (4,0 l) và pha loãng natri clorua bão hòa trong nước (4,8 l). Cô lớp hữu cơ dưới áp suất giảm để tạo ra (2*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (0,73 Kg, 96%). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,12 (3H, d), 2,96 (1H, dd), 3,08 (1H, dd), 3,14 - 3,33 (3H, m), 6,98 (1H, d), 7,32 (1H, dd), 7,37 - 7,41 (1H, m), 8,13 (1H, d), 10,86 (1H, s). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 257.

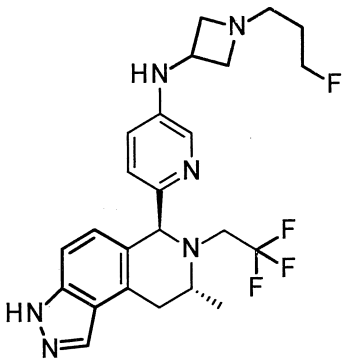
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-2-pyridyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-3,6,8,9-tetrahyđropyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung từ từ axit trifloaxetic (0,66 l, 8,66 mol) vào hỗn hợp có khuấy của 5-bromopicolinalđehyt (0,55 Kg, 2,89 mol) và (*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (0,83 Kg, 2,89 mol) trong toluen (7,30 l) ở nhiệt độ 21 °C. Gia nhiệt dung dịch thu được lên 80°C và khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 18 giờ. Tăng nhiệt độ lên 90°C và tiếp tục gia nhiệt trong thời gian 4 giờ. Để cho hỗn hợp nguội xuống 80°C và bổ sung phần khác nữa của 5-bromopicolinalđehyt (0,015 Kg, 0,081 mol) và khuấy dung dịch ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 16 giờ. Để cho hỗn hợp nguội xuống 21 °C và bổ sung $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (6,60 l) trong 20 phút. Bổ sung EtOAc (5,00 l) và các lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (3,30 l) và cô dưới áp suất giảm. Bổ sung etanol và cô hỗn hợp dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô dưới dạng chất rắn giòn. Loại bỏ chất đồng phân cis bằng SFC điều chế (cột SuperSep 1™ (đã nhồi CelluCoat™ 10 µm), đường kính 50 mm, chiều dài 250 mm), rửa giải EtOH 28% trong CO_2, pha động 140 bar ở tốc độ dòng chảy bằng 450 ml/phút ở nhiệt độ 30°C) để tạo ra (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-2-pyridyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-3,6,8,9-tetrahyđropyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,94 Kg, 77%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,16 (3H, d), 2,89 (1H, dd), 2,99 (1H, dq), 3,25 - 3,34 (2H, m), 3,55 (1H, td), 5,10 (1H, s), 6,93 (1H, d), 7,22 (1H, d), 7,40 (1H, d), 7,75 (1H, dd), 8,05 (1H, d), 8,56 (1H, dd), 10,24 (1H, s). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 427.

Cách thay thế #2 đối với Ví dụ 17:

Điều chế *N*-[1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl]-6-[(6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-3,6,8,9-tetrahyđropyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl]pyriđin-3-amin



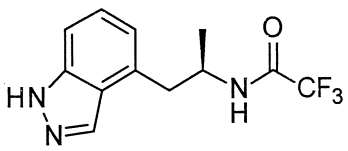
Bổ sung 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (6,31 g, 37,98 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (15,47 g, 34,92 mmol) trong 1,4-đioxan (175 ml). Khử khí dung dịch thu được dưới chân không trong thời gian 5 phút, sau đó làm đầy lại bằng nitơ (x2). Bổ sung natri *tert*-butoxit (13,43 g, 139,69 mmol), sau đó là tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (0,95 g, 1,05 mmol). Gia nhiệt hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 18 giờ. Rót hỗn hợp vào EtOAc và nước. Bổ sung nước muối bão hòa, và các lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng natri clorua bão hòa trong nước (x3), và chiết các lớp nước kết hợp bằng EtOAc. Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% metanol trong etyl axetat. Kết hợp các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn, cô dưới áp suất giảm, và sau đó tái tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 40% EtOAc trong hexan, để thu được chất rắn màu đỏ-cam. Hòa tan chất rắn này trong MeOH 10% trong DCM, lọc, rửa bánh lọc bằng DCM. Cô dịch lỏng đã được kết hợp dưới áp suất giảm để tạo ra *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (15,28 g, 92%) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu cam sáng. Các chất đồng phân trans và cis được tách riêng bằng SFC điều chế ((*S*,*S*) cột Whelk-O1, đường kính 30 mm, chiều dài 250 mm), rửa giải bằng 30% (NH_4OH 0,2% trong MeOH) trong CO_2, pha động 100 bar ở tốc độ dòng chảy bằng 20 ml/phút ở nhiệt độ 40°C). Cô các phân đoạn chứa chất đồng phân trans dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được thêm bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% MeOH trong EtOAc.

Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn dưới áp suất giảm, sau đó cô từ MeCN (x 2) để tạo ra *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (10,76 g, 74%) dưới dạng chất rắn/bọt màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,07 (3H d) 1,63 (2H, dquin), 2,45 (2H, t), 2,72 (2H, br t), 2,83 (1H, br dd), 2,91 - 3,00 (1H, m), 3,06 (1H, br dd) 3,42 - 3,55 (2H, m), 3,58-3,65 (2H, m), 3,92 (1H, dquin) 4,43 (2H, dt) 4,92 (1H, s), 6,22 (1H, d), 6,79 (1H, d) 6,82 (1H, dd), 6,96 (1H, d), 7,21 (1H, d), 7,73 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,96 (1H, s). *m/z*: ES+ (M+H)+ 477.

Cô các phân đoạn từ SFC chứa chất đồng phân cis dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được thêm bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% MeOH trong EtOAc. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn dưới áp suất giảm, và lọc phần cặn thu được để thu được *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (1,13 g, 8%) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu vàng sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,28 (3H, d), 1,55 - 1,75 (2H, m), 2,42 - 2,49 (2H, m), 2,76 (2H, br t), 2,80 - 2,92 (1H, m), 3,07 - 3,18 (1H, m), 3,18 - 3,28 (1H, m), 3,38 - 3,54 (2H, m), 3,59 - 3,70 (2H, m), 3,95 (1H, sxt), 4,45 (2H, dt), 5,11 (1H, s), 6,21 (1H, d), 6,72 (1H, d), 6,82 (1H, dd), 7,02 (1H, d), 7,19 (1H, d), 7,78 (1H, d), 8,06 (1H, s), 12,94 (1H, s). *m/z*: ES+ (M+H)+ 477.

Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin được mô tả dưới đây.

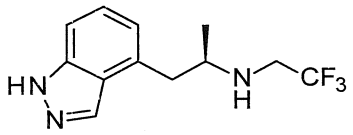
<u>Điều chế 2,2,2-triflo-*N*-[(1*R*)-2-(1H-inđazol-4-yl)-1-metyl-etyl]axetamit</u>



Bổ sung TEA (26,0 ml, 186,5 mmol) qua bơm tiêm vào bột nhão có khuấy của (*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin đihyđroclorua (15,29 g, 61,61 mmol) và etyl 2,2,2-trifloaxetat (8,09 ml, 67,8 mmol) trong MeOH (150 ml) ở nhiệt độ

trong phòng. Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ sau đó cô dưới áp suất giảm. Sau đó hòa tan chất rắn thu được trong DCM (40 ml) và làm kết tủa trietylamin hyđroclorua dư bằng cách bổ sung Et_2O (300 ml). Khuấy bột nhão trong thời gian 5 phút sau đó lọc và cô dịch lọc dưới áp suất giảm để tạo ra chất rắn. Hòa tan chất rắn trong EtOAc và natri clorua bão hòa trong nước. Các lớp được tách riêng và rửa lớp hữu cơ bằng bão hòa natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên $MgSO_4$, lọc và cô để thu được (*R*)-*N*-(1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)-2,2,2-trifloaxetamit (16,51 g, 99%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,19 (3H, d), 3,03 (1H, dd), 3,13 (1H, dd), 4,13 - 4,30 (1H, m), 6,89 (1H, d), 7,25 (1H, dd), 7,38 (1H, d), 8,18 (1H, t), 9,35 (1H, br d), 13,01 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 272.

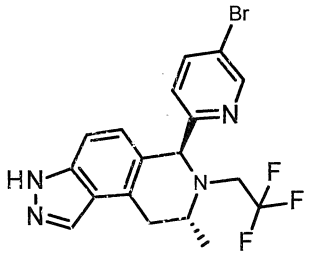
Điều chế (2*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin



Bổ sung nhanh từng giọt phức hợp boran THF 1M trong THF (365 ml, 365,0 mmol) qua ống thông vào dung dịch có khuấy của (*R*)-*N*-(1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)-2,2,2-trifloaxetamit (16,5 g, 60,8 mmol) trong THF (100 ml) ở nhiệt độ trong phòng (thoát khí; tỏa nhiệt ít quan sát được trong khoảng thời gian bổ sung). Sau đó gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 15,5 giờ sau đó để cho nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Đặt phản ứng trong bể nước ở nhiệt độ môi trường xung quanh và bổ sung từ từ từng giọt MeOH (80 ml). Cô hỗn hợp phản ứng dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được trong MeOH (80 ml) và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong MeOH (250 ml) và đặt trong bể nước ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Bổ sung bột nhão của paladi 10% trên cacbon (6,47 g, 6,08 mmol) trong MeOH (90 ml), súc rửa bình thót cổ bằng MeOH (10 ml) (thấy thoát khí một chút). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian xấp xỉ 3 phút sau đó gia nhiệt ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 2 giờ, sau khi nguội xuống nhiệt độ trong phòng, lọc hỗn hợp qua xelit và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn màu vàng nhạt trong DCM và lọc và cô dịch lọc dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh,

gradien rửa giải từ 10 đến 60% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn dưới áp suất giảm để thu được (*R*)-1-(1H-indazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (14,21 g, 86%) dưới dạng dầu màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,91 (3H, d), 2,17 - 2,30 (1H, m), 2,71 (1H, dd), 2,98 - 3,17 (2H, m), 3,22 - 3,38 (2H, m), 6,89 (1H, d), 7,24 (1H, dd), 7,35 (1H, d), 8,12 (1H, t), 12,97 (1H, br s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 258.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-2-pyridyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-3,6,8,9-tetrahydropyrazolo[4,3-f]isoquinolin

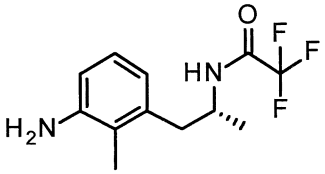


Bổ sung 5-bromopicolinaldehyt (9,80 g, 52,7 mmol) vào dung dịch có khuấy của (*R*)-1-(1H-indazol-4-yl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (14,05 g, 51,66 mmol) trong toluen (246 ml) dưới nitơ. Sau đó bổ sung axit trifloaxetic (12,30 ml) và gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 4,5 giờ. Để cho hỗn hợp nguội xuống nhiệt độ trong phòng và bổ sung EtOAc (200 ml). Làm nguội hỗn hợp xuống 5°C và bazơ hóa hỗn hợp bằng cách bổ sung từ từ $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Các lớp thu được được tách riêng và chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x 80 ml). Rửa các dịch chiết hữu cơ đã được kết hợp bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên $MgSO_4$, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 5 đến 60% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn dưới áp suất giảm, sau đó làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 3 giờ để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyridin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (19,29 g, 88%) dưới dạng chất rắn màu da cam nhạt. Phân tích 1H NMR phát hiện thấy các chất đồng phân trans/cis 10:1. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,10 (3H, d), 2,83 - 2,94 (1H, m), 2,95 - 3,14 (2H, m), 3,34 - 3,47 (1H, m), 3,49 - 3,72 (1H, m), 5,10 (1H, s), 6,88 (1H, d), 7,25 (1H, d), 7,33 (1H, d), 7,99 (1H, dd), 8,06 (1H, d), 8,56

(1H, d), 13,00 (1H, s) *m/z*: ES+ [M+H]+ 425.

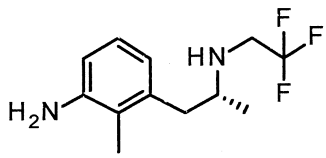
Cách thay thế cho hợp chất trung gian được sử dụng trong phương pháp tổng hợp trong Ví dụ 17:

Điều chế *N*-[(1*R*)-2-(3-amino-2-metyl-phenyl)-1-metyl-etyl]-2,2,2-triflo-axetamit



Khuấy dung dịch của (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (0,51 g, 3,13 mmol), DIPEA (0,55 ml, 3,13 mmol), và etyl 2,2,2-trifloaxetat (0,47 ml, 3,91 mmol) trong MeOH (9,5 ml) ở nhiệt độ trong phòng dưới nitơ trong thời gian 16 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng dưới áp suất giảm. Bổ sung DCM và nước và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng DCM (3 x 50 ml), và làm khô các lớp hữu cơ kết hợp (Na_2SO_4) và lọc. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 100% EtOAc trong hexan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được *N*-[(1*R*)-2-(3-amino-2-metyl-phenyl)-1-metyl-etyl]-2,2,2-triflo-axetamit (680 mg, 83%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,06 - 1,14 (m, 3 H), 2,01 (s, 3 H), 2,54 - 2,71 (m, 1 H), 2,72 - 2,84 (m, 1 H), 4,04 - 4,12 (m, 1 H), 4,60 - 4,77 (m, 2 H), 6,24 - 6,37 (m, 1 H), 6,43 - 6,52 (m, 1 H), 6,72 - 6,84 (m, 1 H), 9,19 - 9,32 (m, 1 H). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 261.

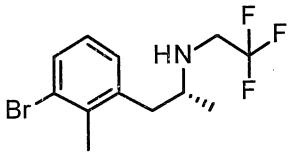
Điều chế 2-metyl-3-[(2*R*)-2-(2,2,2-trifloetylamino)propyl]anilin



Bổ sung boran 1,0M trong THF, trong THF (19,4 ml, 19,37 mmol) vào dung dịch có khuấy của (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2,2-trifloaxetamit (840 mg, 3,23 mmol) trong THF (10 ml). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 65°C dưới nitơ trong thời gian 6 giờ. Để cho hỗn hợp nguội xuống nhiệt độ trong phòng và bổ sung cẩn thận MeOH. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút và sau đó cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong MeOH và gia nhiệt lên 65°C trong thời gian 6 giờ.

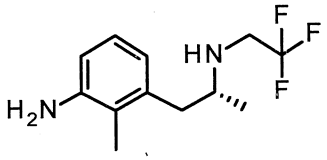
Để cho hỗn hợp nguội xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 100% EtOAc trong hexan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được 2-metyl-3-[(2*R*)-2-(2,2,2-trifloetylamino)propyl]anilin (665 mg, 84%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,89 (s, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 2,08 - 2,22 (m, 1 H), 2,25 - 2,42 (m, 1 H), 2,69 - 2,87 (m, 2 H), 3,15 - 3,29 (m, 2 H), 4,61 - 4,75 (m, 2 H), 6,30 - 6,40 (m, 1 H), 6,43 - 6,54 (m, 1 H), 6,71 - 6,83 (m, 1 H). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 247.

Điều chế (2*R*)-1-(3-bromo-2-metyl-phenyl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin



Bổ sung DIPEA (2,99 ml, 17,10 mmol) vào (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)propan-2-amin (1,30 g, 5,70 mmol), và 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (0,23 M trong DCM, 29,7 ml, 6,84 mmol) trong 1,4-đioxan (25 ml) ở nhiệt độ trong phòng dưới nitơ. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 16 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng dưới áp suất giảm và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong heptan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm dưới áp suất giảm để thu được (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (0,56 g, 32%) dưới dạng dầu. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,91 (3H, d), 2,26 (1H, q), 2,34 (3H, s), 2,78 - 2,86 (1H, m), 2,89 (1H, dd), 3,19 - 3,28 (2H, m), 7,01 - 7,06 (1H, m), 7,15 (1H, dd), 7,43 (1H, dd). *m/z*: ES+ [M+H]+ 310/312.

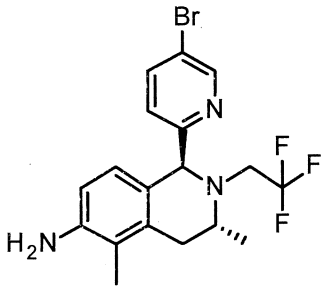
Điều chế 2-metyl-3-[(2*R*)-2-(2,2,2-trifloetylamino)propyl]anilin



Bổ sung tris(đibenzyliđenaxeton)đipalađi(0) (0,050 g, 0,05 mmol) và (±)-2,2′-Bis(điphenylphosphino)-1,1′-binaphtalen (0,067 g, 0,11 mmol) vào huyền phù của (*R*)-1-(3-bromo-2-metylphenyl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (0,56 g, 1,81 mmol), benzophenon imin (0,33 ml, 1,99 mmol) và natri *tert*-butoxit (0,26

g, 2,71 mmol) trong toluen đã khử khí (7 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 90°C trong thời gian 16 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, cô hỗn hợp dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn trong DCM (50 ml) và rửa bằng nước (50 ml). Chiết lớp nước bằng DCM (25 ml) và cô các chất hữu cơ kết hợp xuống ~25 ml. Bổ sung dung dịch HCl 2 M (50 ml) và khuấy mạnh hỗn hợp hai pha này trong thời gian 30 phút. Các lớp được tách riêng và rửa lớp nước bằng DCM. Bazơ hóa pha nước bằng cách bổ sung NaOH trong nước 2 M. Chiết hỗn hợp thu được bằng DCM (2 x 100 ml) và cô các dịch chiết hữu cơ đã được kết hợp dưới áp suất giảm để tạo ra (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (0,31 g, 70%) dưới dạng dầu. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,90 (3H, d), 1,98 (3H, s), 2,12 - 2,18 (1H, m), 2,30 - 2,36 (1H, m), 2,74 - 2,82 (2H, m), 3,17 - 3,29 (2H, m), 4,69 (2H, s), 6,35 (1H, dd), 6,48 (1H, dd), 6,78 (1H, t). ES+ [M+H]+ 247.

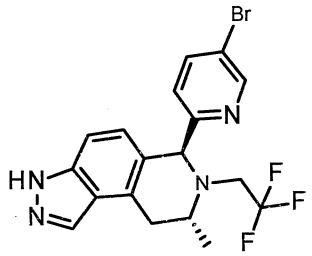
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromo-2-pyridyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-3,4-đihyđro-1H-isoquinolin-6-amin



Bổ sung muối yttecbi(III) của axit triflometansulfonic (0,17 g, 0,27 mmol) vào dung dịch có khuấy của (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (1,35 g, 5,49 mmol), 5-bromopicolinalđehyt (1,02 g, 5,49 mmol) và nước (0,49 ml, 27,43 mmol) trong MeCN (21,5 ml). Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 1 giờ. Cô hỗn hợp dưới áp suất giảm và tải khô phần cặn lên silicagel và tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 10 đến 30% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (2,22 g, 98%) dưới dạng gôm màu hơi vàng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,88 (3H, d), 1,91 (3H, s), 2,37 - 2,46 (1H, m), 2,60 - 2,76 (1H, m), 2,76 - 3,00 (1H,

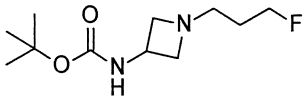
m), 3,15 - 3,28 (1H, m), 3,34 - 3,63 (1H, m), 4,65 (2H, s), 4,85 (1H, s), 6,19 - 6,52 (2H, m), 7,10 - 7,31 (1H, m), 7,97 (1H, dd), 8,62 (1H, d). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 414.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-2-pyridyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-3,6,8,9-tetrahyđropyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Làm lạnh (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (2,21 g, 5,33 mmol) trong axit propionic (14,0 ml) xuống -20°C. Bổ sung từng giọt dung dịch của natri nitrit (0,40 g, 5,86 mmol) trong nước (2,8 ml) trong 5 phút, giữ nhiệt độ bể giữa -20°C và -15°C. Khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ –20°C trong thời gian 45 phút. Rót toluen (80 ml), đã lạnh xuống –15°C, vào phản ứng, và khuấy phản ứng trong thời gian 15 phút. Bổ sung từ từ dung dịch của natri cacbonat (12,0 g, 113 mmol) trong nước (125 ml) và để cho hỗn hợp ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Bổ sung EtOAc (100 ml) và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng $CHCl_3$/IPA (3:1) (100 ml). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 15 đến 50% EtOAc trong hexan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (1,63 g, 72%) dưới dạng chất rắn màu nâu. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,10 (3H, d), 2,83 - 2,96 (1H, m), 2,96 - 3,14 (2H, m), 3,35 - 3,48 (1H, m), 3,49 - 3,73 (1H, m), 5,11 (1H, s), 6,87 (1H, d), 7,27 (1H, d), 7,35 (1H, d), 7,99 (1H, dd), 8,09 (1H, s), 8,53 - 8,63 (1H, m), 12,96 (1H, s). *m/z*: ES+ $[M+H]^+$ 425.

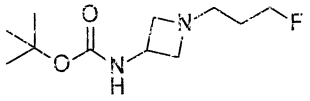
Điều chế *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat



Khuấy huyền phù của *tert*-butyl azetiđin-3-ylcarbamat (10,00 g, 58,06

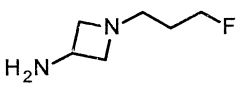
mmol), 1-flo-3-iođopropan (11,13 g, 59,22 mmol) và kali cacbonat (16,05 g, 116,13 mmol) trong MeCN (200 ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 ngày. Loại bỏ chất rắn bằng cách lọc và cô dịch lọc dưới áp suất giảm. Xử lý phần cặn bằng nước và chiết bằng DCM. Làm khô các dịch chiết hữu cơ đã được kết hợp trên Na_2SO_4, lọc và cô dưới áp suất giảm để tạo ra *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (13,40 g, 99%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,45 (9H, s), 1,61 - 1,92 (2H, m), 2,51 - 2,67 (2H, m), 2,85 (2H, br s), 3,57 - 3,72 (2H, m), 4,30 (1H, br d), 4,36 - 4,63 (2H, m), 4,89 (1H, br d).

Điều chế theo cách khác *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat



Bổ sung triflometansulfonic anhyđrit (2,31 ml, 13,75 mmol), sau đó là 2,6-đimetylpyriđin (1,74 ml, 15,00 mmol) vào dung dịch của 3-flopropan-1-ol (0,94 ml, 12,5 mmol) trong DCM (47 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1 giờ. Rửa hỗn hợp phản ứng bằng HCl 1N, sau đó làm khô lớp hữu cơ và làm bay hơi cẩn thận. Sau đó bổ sung phần cặn vào bình thót cổ riêng rẽ chứa huyền phù của *tert*-butyl azetiđin-3-ylcarbamat (1,94 g, 11,25 mmol) và DIPEA (3,24 ml, 18,75 mmol) trong đioxan/DCM (1:1, 40 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng (tỏa nhiệt khi bổ sung triflat). Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng DCM và rửa bằng dung dịch NH_4Cl. Làm khô và làm bay hơi lớp hữu cơ dưới áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 10% NH_3/MeOH 1M trong DCM. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (2,82 g, 97%) dưới dạng dầu màu hoa cà ^{1}HNMR như nêu trên.

Điều chế 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung từng giọt axit trifluroaxetic (39,8 ml, 517 mmol) trong 30 phút vào dung dịch của *tert*-butyl (1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)carbamat (20,0 g, 86

mmol) trong DCM (67,8 ml) mà đã được nhúng trong bể nước. Sau 18 giờ, cô phản ứng dưới áp suất giảm để thu được dầu màu da cam. Hòa tan dầu này trong metanol 10% trong DCM (125 ml) và bổ sung kali cacbonat (71,4 g, 517 mmol) có khuấy mạnh. Sau 15 phút, bổ sung 30 g nữa của kali cacbonat. Việc khuấy trở nên chậm dần, và bổ sung xelit (~15 g). Tiếp tục khuấy trong 15 phút nữa, và lọc hỗn hợp bằng metanol 10% trong dịch rửa DCM. Cô dịch lọc dưới áp suất giảm trên máy bay hơi quay (áp suất: 100 mbar, nhiệt độ bể nước: 30°C), và tinh chế dầu màu da cam thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh (λ phát hiện = 210 nm), gradien rửa giải từ 0 đến 15% (amoniac 2 M trong metanol) trong DCM để thu được 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (12,8 g) tạp nhiễm metanol 28 % theo khối lượng dựa trên sự kết hợp NMR dưới dạng dầu màu vàng. Nguyên liệu này có thể được sử dụng trực tiếp, được lưu trữ trong máy kết đông để sử dụng sau, hoặc được tinh chế thêm bằng cách chưng cất chân không như theo ví dụ sau đây: Chưng cất 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (14,8 g) dưới dạng dầu màu vàng sáng bằng cách sử dụng thiết bị chưng cất đường ngắn với việc làm mát bằng nước có vỏ bọc trong điều kiện chân không (bơm chân không). Nhúng bình thót cổ chứa amin trong bể dầu, và tăng nhiệt độ bể từ từ lên 140°C trong khoảng thời gian 30 phút. Sự chưng cất diễn ra với nhiệt độ bể bằng 110-135°C và nhiệt độ đầu gần bằng 70°C để thu được 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (12,4 g, 84%) dưới dạng dầu không màu trong. Lưu trữ dầu này trong máy kết đông trước khi sử dụng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,52 - 1,70 (2H, m), 1,75 (2H, br s), 2,38 (2H, t), 2,43 - 2,48 (2H, m), 3,27 - 3,39 (1H, m), 3,42 - 3,48 (2H, m), 4,43 (2H, dt). *m/z*: ES+ [M+H]+ 133.

Ví dụ 17A: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng A (dạng khan)

Phương pháp 1

Hòa tan 4,0 mg *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin vô định hình trong 100 ul EtOAc để tạo thành dung dịch trong. Bổ sung từ từ khoảng 200 ul heptan vào dung dịch, tạo thành huyền phù đục. Khuấy bột nhão

ở điều kiện môi trường xung quanh trong thời gian 3 ngày. Thu được nguyên liệu kết tinh của Dạng A.

Phương pháp 2

Tạo huyền phù 1,60 g *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin vô định hình trong 15 ml hỗn hợp axeton/H_2O (10:1). Bột nhão được tạo thành, và sau đó gel được tạo thành. Bổ sung 10 mg chất cấy *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng A sau 2 giờ, và khuấy huyền phù ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong thời gian 1 ngày khi đó gel trở thành bánh rắn. Loại bỏ bằng tay bánh rắn trên thành và đáy vào dung dịch, và thu được bột nhão đồng nhất sau khi khuấy trong thời gian 1 giờ. Thu gom chất rắn bằng cách lọc và rửa bằng 5,0 ml axeton/H_2O (1:10) hai lần, sau đó bằng H2O một vài lần. Thu được 1,45 g bột màu trắng (hiệu suất 90%) dưới dạng Dạng A sau khi làm khô trong chân không trong thời gian 4 giờ.

Phương pháp 3

Hòa tan 501 mg nguyên liệu vô định hình của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin trong 1,0 ml EtOAc để tạo thành dung dịch màu nâu. Bổ sung từ từ 1,0 ml heptan vào dung dịch này. Khi kết thúc việc bổ sung, chất rắn bắt đầu tạo thành nhưng sau đó hòa tan. Bổ sung 2-5 mg *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin-Dạng A vào dung dịch màu nâu trong, khi đó chất rắn bắt đầu kết tủa. Khuấy huyền phù ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong thời gian 1 ngày. Thu gom chất rắn bằng cách lọc và làm khô trong không khí. Thu được 345 mg bột màu trắng nhờ (hiệu suất: ~69%) dưới dạng Dạng A.

Dạng A từ phương pháp 2 được phân tích bằng XRPD và kết quả được lập bảng dưới đây (Bảng 1) và được thể hiện trên Hình 1.

Bảng 1. Các đỉnh XRPD đối với Dạng A

Góc (2θ±0,2°)	Cường độ (%)

21,1	100,0
20,8	54,3
14,6	41,9
18,6	41,6
12,3	38,9
15,5	34,1
24,6	31,3
15,8	30,6
13,4	23,2
19,0	21,7

Dạng A được phân tích bằng các kỹ thuật nhiệt. Phân tích DSC chỉ ra rằng Dạng A có điểm nóng chảy với sự khởi đầu ở 132 °C và đỉnh ở 137°C. TGA chỉ ra rằng Dạng A thể hiện sự mất khối lượng bằng khoảng 0,2 % khi gia nhiệt từ khoảng 25°C đến khoảng 100°C. Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đại diện của Dạng A được thể hiện trên Hình 2.

Ví dụ 17B: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng B (TBME solvat)

Hòa tan một phần 100 mg *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (nguyên liệu vô định hình) trong 1,0 ml TBME. Khuấy huyền phù trong điều kiện môi trường xung quanh, khi đó nhiều chất rắn hơn kết tủa ra trong huyền phù. Khuấy bột nhão trong thời gian 2 giờ. *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin-Dạng B được xác định khi bột nhão được tính tổng số một cách trực tiếp trong thiết bị giữ mẫu để xác định đặc điểm bằng XRPD. Dạng B biến đổi thành Dạng C sau khi chất rắn được lọc và làm khô trong điều kiện môi trường xung quanh.

Dạng B được phân tích bằng XRPD và kết quả được lập bảng dưới đây (Bảng 2) và được thể hiện trên Hình 3.

Bảng 2. Các đỉnh XRPD đối với Dạng B

Góc (2θ±0,2°)	Cường độ (%)
6,0	100,0

17,8	67,0
18,4	34,9
16,3	30,3
21,5	29,2
12,3	27,0
17,2	24,8
13,4	23,3
18,1	21,6
15,6	20,6

Ví dụ 17C: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng C (TBME solvat)

200 mg nguyên liệu vô định hình N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin hầu như được hòa tan trong 1 ml TBME. Khuấy huyền phù trong điều kiện môi trường xung quanh, khi đó nhiều chất rắn hơn kết tủa ra sau 10 phút. Khuấy bột nhão trong thời gian 2 giờ và sau đó làm bay hơi trong điều kiện môi trường xung quanh. Thu được Dạng C sau khi làm khô chất rắn thu được trong điều kiện môi trường xung quanh.

Dạng C được phân tích bằng XRPD và kết quả được lập bảng dưới đây (Bảng 3) và được thể hiện trên Hình 4.

Bảng 3. Các đỉnh XRPD đối với Dạng C

Góc (2θ±0,2°)	Cường độ (%)
6,8	100,0
18,6	64,1
13,9	62,5
18,0	61,6
17,2	53,4
17,4	52,4
20,5	47,3
19,2	40,0
20,7	37,4
13,7	36,3

Dạng C được phân tích bằng các kỹ thuật nhiệt. Phân tích DSC chỉ ra rằng Dạng C có hiện tượng thu nhiệt của sự khử solvat hóa với sự khởi đầu ở 75°C và

đỉnh ở 84 °C. TGA chỉ ra rằng Dạng C thể hiện sự mất khối lượng bằng khoảng 7,1 % khi gia nhiệt từ khoảng 25°C đến khoảng 150°C. Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đại diện của Dạng C được thể hiện trên Hình 5.

Ví dụ 17D: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng D (CPME solvat)

Khuấy 150 mg nguyên liệu vô định hình N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin trong 2,0 ml CPME (xyclopentyl metyl ete). Sau khi khuấy trong thời gian 1 ngày, chất rắn được phân lập bằng cách lọc và làm khô trong không khí. Thu được ~ 50 mg bột màu trắng của Dạng D.

Dạng D được phân tích bằng XRPD và kết quả được lập bảng dưới đây (Bảng 4) và được thể hiện trên Hình 6.

Bảng 4. Các đỉnh XRPD đối với Dạng D

Góc (2θ±0,2°)	Cường độ (%)
6,2	100,0
18,3	55,0
18,9	24,3
16,1	21,8
16,8	18,4
22,2	17,9
14,1	17,1
19,9	13,5
22,5	13,5
23,9	13,4

Dạng D được phân tích bằng các kỹ thuật nhiệt. Phân tích DSC chỉ ra rằng Dạng D có hiện tượng thu nhiệt của sự khử solvat hóa với sự khởi đầu ở 76 °C và đỉnh ở 81 °C, sau đó là hiện tượng thu nhiệt khác với sự khởi đầu ở 128°C và đỉnh ở 133 °C. TGA chỉ ra rằng Dạng D thể hiện sự mất khối lượng bằng khoảng 6,8 % khi gia nhiệt từ khoảng 25°C đến khoảng 150°C. Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đại diện của Dạng D là được thể hiện trên Hình 7.

Ví dụ 17E: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-

amin Dạng E (dạng khan)

Phương pháp 1

Bổ sung 100 mg N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin vô định hình vào 2,0 ml heptan để tạo thành bột nhão. Bổ sung 0,40 ml EtOAc. Sau khi khuấy trong thời gian 2 giờ, bổ sung thêm 0,10 ml EtOAc vào bột nhão và khuấy bột nhão trong điều kiện môi trường xung quanh trong thời gian 18 giờ, khi đó dạng kết tinh mới, Dạng E, được xác định bằng XRPD. Thu được 75 mg chất rắn màu trắng của Dạng E sau khi chất rắn được phân lập và làm khô ở điều kiện môi trường xung quanh (hiệu suất: 75%).

Phương pháp 2

Hòa tan 1,002 g N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin vô định hình trong 5,0 ml EtOAc để thu được dung dịch màu nâu sáng trong. Bổ sung 5,0 ml heptan và dung dịch vẫn trong. Bổ sung 10 mg chất mầm N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin-Dạng E, và khuấy huyền phù ở nhiệt độ môi trường. Chất rắn bắt đầu kết tủa trong điều kiện môi trường xung quanh, và bánh ướt được tạo thành sau 1 giờ. Bổ sung từ từ 5,0 ml EtOAc vào bột nhão và khuấy bột nhão thu được ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 1 giờ. Bổ sung 10 ml heptan nữa, thêm chất rắn bắt đầu kết tủa. Sau khi khuấy trong điều kiện môi trường xung quanh trong thời gian 2 giờ, gia nhiệt bột nhão lên 60 °C và khuấy ở nhiệt độ 60 °C trong thời gian 2 giờ. Làm nguội bột nhão xuống nhiệt độ môi trường xung quanh và khuấy trong thời gian 18 giờ. Chất rắn màu trắng nhờ của Dạng E được phân lập bằng cách lọc và rửa bằng dung môi hỗn hợp EtOAc/heptan 1: 4 trong 3 lần. Thu gom 0,875 g bột màu trắng nhợt sau khi làm khô trong không khí (hiệu suất: 87%).

Dạng E từ phương pháp 1 được phân tích bằng XRPD và kết quả được lập bảng dưới đây (Bảng 5) và được thể hiện trên Hình 8.

Bảng 5. Các đỉnh XRPD đối với Dạng E

Góc (2θ±0,2°)	Cường độ (%)

17,9	100,0
14,8	67,1
20,9	60,1
23,1	55,4
16,2	49,3
20,0	35,6
18,2	32,9
12,3	30,4
22,2	19,0
13,9	18,9

Dạng E được phân tích bằng các kỹ thuật nhiệt. Phân tích DSC chỉ ra rằng Dạng E có điểm nóng chảy với sự khởi đầu ở 126 °C và đỉnh ở 133 °C. TGA chỉ ra rằng Dạng E thể hiện sự mất khối lượng bằng khoảng 0,8 % khi gia nhiệt từ khoảng 25°C đến khoảng 100°C. Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đại diện của Dạng E là được thể hiện trên Hình 9.

Ví dụ 17F: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng F (heptan solvat)

Hòa tan 20 mg N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin vô định hình trong 200 ul axeton. Bổ sung từ từ 1,0 ml heptan vào dung dịch. Dung dịch bắt đầu trờ nên đục và sau đó tạo thành bột nhão. Khuấy bột nhão ở nhiệt độ môi trường xung quanh sau khi bổ sung 1,0 ml heptan. Quan sát thấy hạt giống hình kim trong bột nhão. Gia nhiệt bột nhão lên 60°C và khuấy trong thời gian 2 giờ và sau đó làm nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh. Hạt hình kim được tạo thành.

Bột nhão của Dạng F thu được được phân tích bằng XRPD và kết quả được thể hiện trên Hình 10. Độ kết tinh của Dạng F giảm dần trong quá trình xác định đặc điểm bằng XRPD, và lần chạy thứ hai của XRPD chỉ ra thu được nguyên liệu vô định hình sau khi làm khô trong thiết bị giữ mẫu.

Ví dụ 17F: Điều chế *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin Dạng G (metylpentanon solvat)

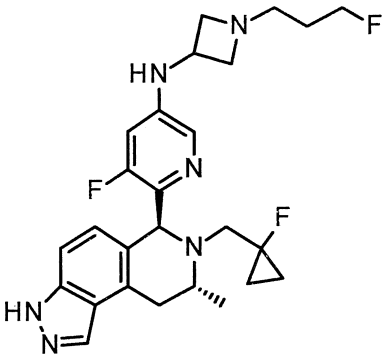
Tạo huyền phù 100 mg N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin vô định hình trong 200 ul metylpentanon, và bổ sung 2-5 mg N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin-Dạng A, khi đó bánh được tạo thành sau khi khuấy trong điều kiện môi trường xung quanh trong thời gian 10 phút. Bổ sung 200 ul metylpentanon và bột nhão được tạo thành. Khuấy bột nhão ở điều kiện môi trường xung quanh trong thời gian 18 giờ. XRPD cho thấy rằng dạng kết tinh, N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin-Dạng G được tạo thành. Dạng G biến đổi thành nguyên liệu vô định hình một phần sau khi phân lập và làm khô trong điều kiện môi trường xung quanh. Dạng G được phân tích bằng XRPD và kết quả được lập bảng dưới đây (Bảng 6) và được thể hiện trên Hình 10.

Bảng 6. Các đỉnh XRPD đối với Dạng G

Góc (2θ±0,2°)	Cường độ (%)
6,2	100,0
18,1	95,9
16,6	38,8
18,7	37,5
21,9	36,5
15,9	33,9
22,4	28,1
19,7	26,4
14,0	24,6
12,6	23,9

Ví dụ 18

5-flo-6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin

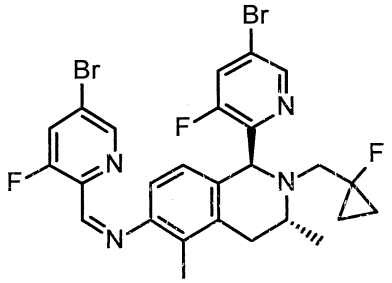


Bổ sung [(2-đi-xyclohexylphosphino-3,6-đimetoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphenyl)-2-(2′-amino-1,1′-biphenyl)]paladi(II) metansulfonat metansulfonat (Brett Phos G3) (48,6 mg, 0,05 mmol) vào dung dịch đã khử khí của 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (95 mg, 0,72 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (155 mg, 0,36 mmol) và natri *tert*-butoxit (206 mg, 2,15 mmol) trong 1,4-đioxan (3 ml) dưới nitơ. Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 2 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (50 ml), và rửa tuần tự bằng nước (50 ml) và natri clorua bão hòa trong nước (50 ml). Làm khô lớp hữu cơ bằng $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế bằng HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, silic oxit 5µ, đường kính 50 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 0,1% NH_3) và MeCN làm các chất rửa giải. Làm bay hơi các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn đến khô để thu được 5-flo-6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (39,0 mg, 22%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,48 - 0,61 (2H, m), 0,92 - 1,09 (2H, m), 1,13 (3H, d), 1,68 - 1,83 (2H, m), 2,56 - 2,62 (2H, m), 2,67 (1H, dd), 2,86 (1H, dd), 2,90 - 2,95 (2H, m), 3,17 (1H, dd), 3,27 (1H, dd), 3,70 (2H, q), 3,87 (1H, td), 4,04 (1H, q), 4,21 (1H, d), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,39 (1H, s), 6,50 (1H, dd), 6,79 (1H, d), 7,12 (1H, d), 7,68 (1H, d), 8,03 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 485.

Điều chế 5-flo-6-((6S,8R)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-

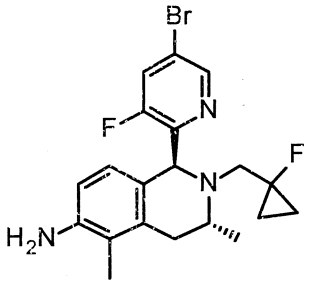
yl)pyriđin-3-amin như sau:

Điều chế 1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-*N*-((1*S*,3*R*)-1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-yl)methanimin



Bổ sung 5-bromo-3-flopicolinalđehyt (1,09 g, 5,33 mmol) vào (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (630 mg, 2,67 mmol) và nước (0,240 ml, 13,33 mmol) trong axit axetic (12 ml). Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 2 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng và pha loãng bằng EtOAc (50 ml) và rửa tuần tự bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (50 ml). Làm khô lớp hữu cơ bằng $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi để thu được 1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-*N*-((1*S*,3*R*)-1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-yl)methanimin dưới dạng sản phẩm thô (1,53 g, 2,51 mmol). *m/z*: ES+ [M+H]+ 607.

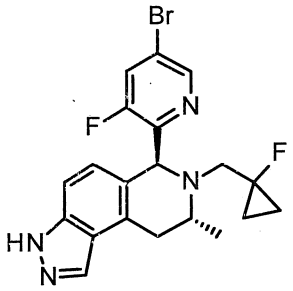
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung hyđroxylamin hyđroclorua (0,174 g, 2,51 mmol) vào 1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-*N*-((1*S*,3*R*)-1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-yl)methanimin (1,53 g, 2,51 mmol) và kali axetat (0,62 g, 6,27 mmol) trong MeOH (12 ml). Khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 5 giờ. Cô hỗn hợp

phản ứng và pha loãng bằng DCM (75 ml) và rửa tuần tự bằng NaOH (2M, 75 ml) và natri clorua bão hòa trong nước (50 ml). Làm khô lớp hữu cơ bằng $MgSO_4$, lọc và làm bay hơi để thu được sản phẩm thô mà được tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 20% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,672 g, 63%) dưới dạng gôm không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,45 - 0,61 (2H, m), 0,92 - 1,06 (2H, m), 1,07 (3H, d), 2,07 (3H, s), 2,51 (1H, dd), 2,59 (1H, dd), 2,85 (1H, dd), 3,13 (1H, dd), 3,52 (2H, s), 3,64 - 3,75 (1H, m), 5,35 (1H, s), 6,48 (2H, s), 7,52 (1H, dd), 8,36 (1H, dd); *m/z*: ES+ [M+H]+ 422/424.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

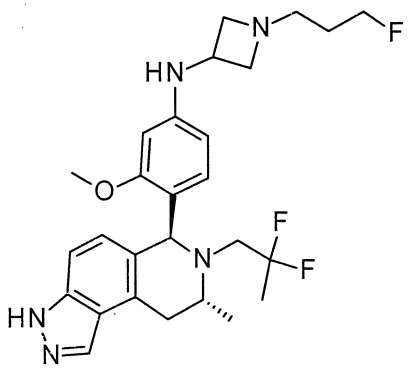


Làm lạnh (1*S*,3*R*)-1-(5-Bromo-3-flopyriđin-2-yl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,672 g, 1,59 mmol) trong axit propionic (6,63 ml) xuống -17°C (nước đá khô/axeton). Bổ sung từng giọt natri nitrit (0,110 g, 1,59 mmol) trong nước (1,33 ml) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -17°C trong thời gian 30 phút. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng toluen lạnh như nước đá (30 ml), khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 15 phút sau đó ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 45 phút. Rửa hỗn hợp phản ứng bằng nước (2 x 25 ml), rửa các pha nước kết hợp bằng EtOAc (25 ml), rửa các chất hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước (50 ml), làm khô ($MgSO_4$), lọc và dịch lọc làm bay hơi để tạo ra dầu màu nâu-da cam. Tinh chế nguyên liệu thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải 0-50% EtOAc trong heptan để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (0,310 g, 45%) dưới dạng chất rắn màu da cam. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$,

27°C) 0,50 - 0,59 (2H, m), 1,03 (2H, dd), 1,13 (3H, d), 2,72 (1H, dd), 2,91 (1H, dd), 3,16 (1H, dd), 3,27 (1H, dd), 3,77 - 3,90 (1H, m), 5,50 (1H, s), 6,80 (1H, d), 7,20 (1H, dd), 7,56 (1H, dd), 8,07 (1H, d), 8,36 (1H, dd); *m/z*: ES+ [M+H]+ 433.

Ví dụ 19

Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

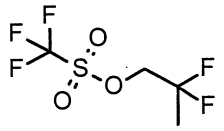


Bổ sung DMF (2 ml) và DIPEA (0,074 ml, 0,42 mmol) tuần tự vào bình thót cổ đã nạp *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin (75 mg, 0,17 mmol). Sau đó bổ sung 1-flo-3-iođopropan (31,9 mg, 0,17 mmol) trong DMF (0,1 ml), và tiếp tục khuấy trong thời gian 2 giờ. Làm dừng phản ứng, pha loãng bằng natri clorua bão hòa trong nước và chiết hợp chất trong EtOAc (x3). Rửa các dịch chiết đã được kết hợp bằng nước và làm khô trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm để thu được màng. Tinh chế nguyên liệu này bằng sắc ký silic oxit nhanh, rửa giải bằng từ 2 đến 10% (metanol chứa 1% amoni hyđroxit) trong DCM để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (43 mg, 51%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (3H, d), 1,45 - 1,70 (5H, m), 2,44 (2H, t), 2,55 - 2,66 (1H, m), 2,66 - 2,72 (2H, m), 2,79 (1H, dd), 2,87 - 3,01 (1H, m), 3,10 (1H, br dd), 3,38 - 3,53 (1H, m), 3,56 - 3,67 (2H, m), 3,77 (3H, s), 3,85 - 3,97 (1H, m), 4,43 (2H, dt), 5,21 (1H, s), 5,88 (1H, dd), 6,00 (1H, d), 6,16 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,64 (1H, d), 7,17 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,92 (1H, d). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 502.

Điều chế nguyên liệu bắt đầu *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-

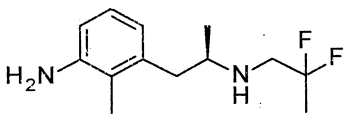
tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin theo các quy trình dưới đây.

Điều chế 2,2-điflopropyl triflometansulfonat



Bổ sung từng giọt triflometansulfonic anhyđrit (3,29 ml, 19,5 mmol) vào dung dịch của 2,2-điflopropan-1-ol (1,7 g, 18 mmol) trong DCM (40 ml) ở nhiệt độ -10°C (bể muối/nước đá). Sau đó bổ sung 2,6-đimetylpyriđin (2,5 ml, 21 mmol), và khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ trong điều kiện này. Sau đó rửa phản ứng bằng nước (x2), và làm khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4, lọc và cô dưới áp suất giảm (chân không ~200 mbar) để thu được 2,2-điflopropyl triflometansulfonat (2,1 g, 52%) dưới dạng dầu màu đỏ. ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 4,48 (2 H, t), 1,73 (3 H, t).

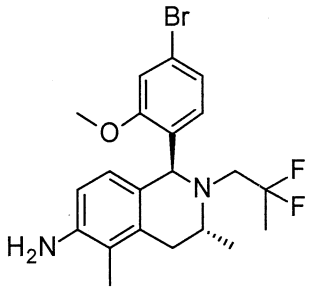
Điều chế (*R*)-3-(2-((2,2-điflopropyl)amino)propyl)-2-metylanilin



Bổ sung 2,2-điflopropyl triflometansulfonat (1,68 g, 7,37 mmol) vào dung dịch có khuấy của (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (1,1 g, 6,7 mmol) và DIPEA (1,52 ml, 8,71 mmol) trong 1,4-đioxan (20 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 3 giờ trước khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và sau đó cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong EtOAc (30 ml) và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Chiết lớp nước bằng EtOAc (20 ml) và làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế dầu màu đỏ thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 30 đến 90% etyl axetat trong hexan, để thu được (*R*)-3-(2-((2,2-điflopropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,02 g, 63%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,90 (3H, d), 1,55 (3H, t), 1,75 (1H, br s), 1,97 (3H, s), 2,29 - 2,38 (1H, m), 2,69 - 2,76 (2H, m), 2,86 (2H, br t), 4,69 (2H, s), 6,34 (1H, d), 6,47 (1H, d), 6,77 (1H, t). *m/z :* (ES+), [M+H]+ = 439.

Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-

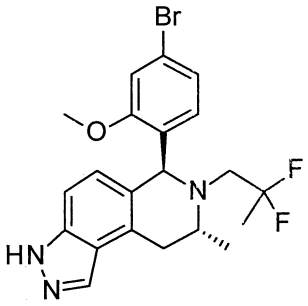
1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 4-bromo-2-metoxybenzalđehyt (1,07 g, 4,95 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-((2,2-điflopropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (0,600 g, 2,48 mmol) trong AcOH (12 ml) và nước (0,223 g, 12,4 mmol), và gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi để nguội, cô các chất dễ bay hơi dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được trong EtOAc. Trung hòa dung dịch bằng cách rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Kết hợp lớp hữu cơ với HCl trong nước (1N), và khuấy hỗn hợp hai pha ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó các lớp được phân tách, và rửa lớp hữu cơ bằng HCl trong nước (1N). Chiết các lớp nước kết hợp bằng EtOAc và sau đó bazơ hóa bằng cách bổ sung K_2CO_3 rắn. Sau đó chiết lớp hữu cơ bằng EtOAc (x2), và làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 10 đến 60% etyl axetat trong hexan, để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,576 g, 53%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,95 (3H, d), 1,54 (3H, t), 1,93 (3H, s), 2,27 - 2,43 (2H, m), 2,57 - 2,74 (1H, m), 2,76 - 2,98 (1H, m), 3,19 - 3,26 (1H, m), 3,84 (3H, s), 4,63 (2H, s), 5,12 (1H, s), 6,26 (1H, d), 6,38 (1H, d), 6,58 (1H, d), 6,94 (1H, dd), 7,16 (1H, d). *m/z :* (ES+), [M+H]+ = 439.

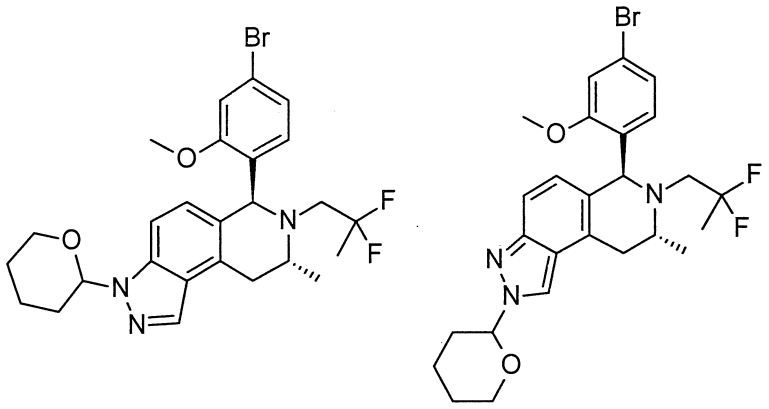
Cũng được phân lập là *N*-((1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-yl)axetamit (0,081 g, 7%) dưới dạng gôm.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung từng giọt natri nitrit (0,049 g, 0,72 mmol) dưới dạng dung dịch trong nước (0,750 ml) vào dung dịch đã được làm nguội của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-2-(2,2-điflopropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,30 g, 0,68 mmol) trong axit propionic (2,5 ml) ở nhiệt độ -15°C, và khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ trong điều kiện này. Bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (10 ml) sau đó là $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (10 ml) từng phần. Các lớp được tách riêng, và rửa lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Chiết các lớp nước kết hợp bằng EtOAc, và tất cả các lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô trên Na_2SO_4, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 20 đến 70% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,23 g, 75%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,01 (3H, d), 1,53 (3H, t), 2,84 (1H, dd), 2,96 - 3,09 (1H, m), 3,14 (1H, br dd), 3,36 - 3,48 (1H, m), 3,89 (3H, s), 5,32 (1H, s), 6,64 (2H, app t), 6,94 (1H, dd), 7,16 - 7,27 (2H, m), 8,06 (1H, s), 12,99 (1H, br s). 1H bị che khuất bởi DMSO. *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 450.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin

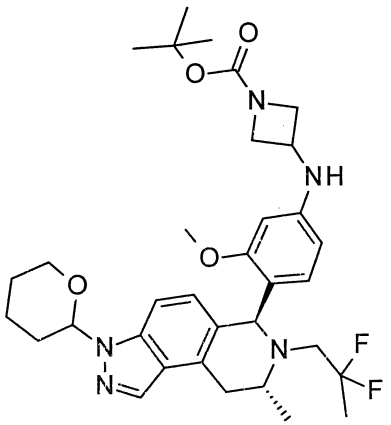


Bổ sung DCM (7 ml) vào bình thót cổ đã nạp (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,3 g, 0,67 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (0,025 g, 0,13 mmol). Bổ sung 3,4-đihyđro-2H-pyran (0,084 g, 1,0 mmol), và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Rửa phản ứng bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước, và làm khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký nhanh, rửa giải bằng từ 5 đến 40% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (175 mg, 49%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,99 - 1,13 (3H, br s), 1,48 - 1,88 (6H, m), 2,01 - 2,08 (1H, m), 2,08 - 2,18 (1H, m), 2,48 - 2,70 (2H, m), 2,82 (1H, dt), 2,88 - 3,04 (1H, m), 3,20 (1H, br d), 3,55 - 3,67 (1H, m), 3,63 - 3,73 (1H, m), 3,88 (3H, s), 3,94 - 3,98 (1H, m), 5,42 (1H, br s), 5,63 (1H, dt), 6,64 (1H, dd), 6,73 (1H, dd), 6,86 (1H, dd), 7,03 (1H, t), 7,25 - 7,29 (1H, m), 7,98 (1H, d). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 534.

Cũng được phân lập là (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (68 mg, 19%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (400MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,02 - 1,07 (3H, m), 1,42 - 1,53 (3H, m), 1,59 - 1,81 (3H, m), 2,03 - 2,09 (1H, m), 2,18 - 2,25 (2H, m), 2,59 (1H, qd), 2,69 (1H, dd), 2,86 - 2,98 (1H, m), 3,02 - 3,14 (1H, m), 3,46 - 3,57 (1H, m), 3,72 - 3,82 (1H, m), 3,87 - 3,90 (3H, m), 4,11 - 4,16 (1H, m), 5,31 (1H, s), 5,61 - 5,68 (1H, m), 6,60 (1H, dd), 6,72 (1H, dd), 6,88 (1H, dt), 7,01 - 7,05 (1H, m), 7,36 (1H, d), 8,09 (1H,

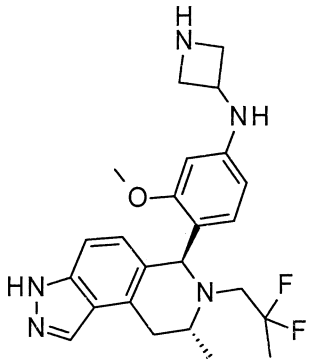
s). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 534.

Điều chế *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat



Bổ sung đioxan (3,5 ml) vào bình thót cổ đã nạp Cs_2CO_3 (213 mg, 0,65 mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (85 mg, 0,49 mmol), và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (175 mg, 0,33 mmol). Làm bay hơi bình thót cổ phản ứng và làm đầy trở lại bằng nitơ (x3). Bổ sung tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (30 mg, 0,03 mmol), và lại làm bay hơi và làm đầy lại bình thót cổ bằng nitơ (x3). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 4 giờ. Làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế gôm thô thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, rửa giải bằng từ 15 đến 70% etyl axetat trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (152 mg, 74%) dưới dạng màng. ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,05 (3H, d), 1,42 (9 H, s), 1,44 - 1,57 (3H, m), 1,57 - 1,63 (1H, m), 1,66 - 1,77 (2H, m), 2,04 - 2,08 (1H, m), 2,09 - 2,18 (1H, m), 2,47 - 2,69 (2H, m), 2,79 (1H, dt), 2,84 - 2,99 (1H, m), 3,16 (1H, br dd), 3,48 - 3,61 (1H, m), 3,69 (3H, dt), 3,83 (3H, s), 3,94 - 4,04 (2H, m), 4,15 (1H, br s), 4,20 - 4,29 (2H, m), 5,32 (1H, s), 5,63 (1H, dt), 5,86 (1H, dd), 6,07 (1H, t), 6,55 (1H, dd), 6,78 (1H, dd), 7,20 - 7,23 (1H, m), 7,98 (1H, d). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 626.

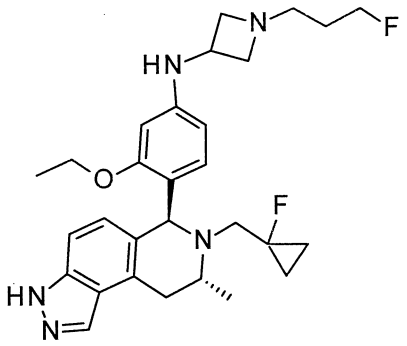
Điều chế *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung metanol (1 ml) và sau đó HCl trong đioxan (4 M; 1 ml, 4 mmol) tuần tự vào bình thót cổ đã nạp *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (140 mg, 0,22 mmol). Sau 2 giờ, cô phản ứng dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được bằng cách sử dụng hộp chứa SCX-2 mà đã được xử lý sơ bộ bằng metanol. Rửa giải hợp chất trước hết bằng metanol và sau đó là amoniac trong metanol (3N). Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin (91 mg, 92%) dưới dạng gôm. Sản phẩm được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (3H, d), 1,52 (3H, t), 2,55 - 2,59 (1H, m), 2,78 (1H, dd), 2,85 - 2,99 (1H, m), 3,09 (1H, dd), 3,39 - 3,50 (1H, m), 3,55 - 3,66 (2H, m), 3,77 (3H, s), 4,03 - 4,14 (1H, m), 5,21 (1H, s), 5,85 (1H, dd), 6,05 (1H, br d), 6,14 (1H, d), 6,34 (1H, d), 6,63 (1H, d), 7,17 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,93 (1H, br s). 3H không được quan sát thấy. *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 442.

Ví dụ 20

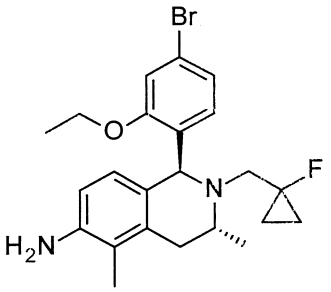
Điều chế *N*-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung DMF (2 ml) và DIPEA (0,050 ml, 0,28 mmol) tuần tự vào bình thót cổ đã nạp *N*-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (0,051 g, 0,11 mmol). Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (0,021 g, 0,11 mmol) dưới dạng dung dịch trong DMF (0,2 ml), và sau 2 giờ, pha loãng phản ứng bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước. Chiết hỗn hợp bằng etyl axetat (x3), và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 2 đến 10% (metanol chứa 1% amoni hyđroxit) trong DCM. Kết hợp các phân đoạn sản phẩm, cô dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh bằng cách sử dụng các điều kiện nêu trên để thu được *N*-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,023 g, 40%). ^{1}H NMR (CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,50 (2H, br d), 0,88 - 1,05 (2H, m), 1,12 (3H, br d), 1,45 (3H, t), 1,75 - 1,87 (2H, m), 2,59 - 2,73 (3H, m), 2,87 - 3,04 (3H, m), 3,04 - 3,15 (1H, m), 3,41 (1H, br dd), 3,73 - 3,90 (3H, m), 3,93 - 4,18 (4H, m), 4,52 (2H, dt), 5,37 (1H, br s), 5,99 (1H, dd), 6,13 (1H, br d), 6,80 - 6,89 (2H, m), 7,14 (1H, d), 8,06 - 8,08 (1H, m), 10,02 (1H, br s). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 510.

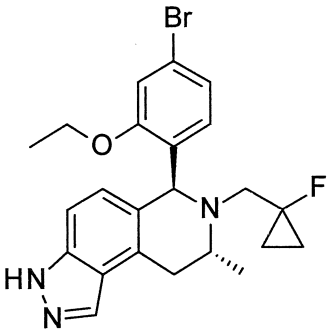
Các quy trình được sử dụng để điều chế *N*-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin được mô tả dưới đây.

<u>Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin</u>



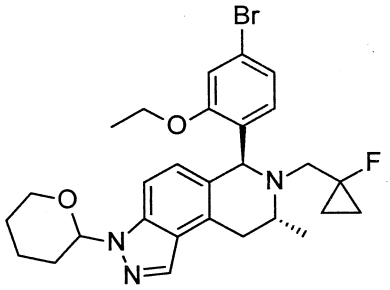
Bổ sung 4-bromo-2-etoxybenzalđehyt (0,775 g, 3,39 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-(((1-floxyclopropyl)metyl)amino)propyl)-2-metylanilin (0,400 g, 1,69 mmol) trong AcOH (9 ml) và nước (0,152 g, 8,46 mmol). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi để nguội, cô phản ứng dưới áp suất giảm, và sau đó hòa tan phần cặn trong EtOAc và rửa bằng bão hòa trong nước $NaHCO_3$. Các lớp được tách riêng, và kết hợp pha hữu cơ với axit clohyđric trong nước (1N). Sau khi khuấy hỗn hợp hai pha trong thời gian 30 phút, các lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng HCl trong nước (1N), và chiết các lớp nước kết hợp bằng EtOAc (x2). Sau đó bazơ hóa các lớp nước kết hợp bằng cách bổ sung K_2CO_3 rắn và chiết bằng EtOAc (x2). Các dịch chiết hữu cơ được kết hợp, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 10 đến 60% etyl axetat trong hexan để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,48 g, 63%) dưới dạng chất rắn. 1H NMR (400MHz, DMSO-d_6 , 27°C) 0,40 - 0,59 (2H, m), 0,83 - 0,93 (2H, m), 0,94 (3H, d), 1,35 (3H, t), 1,93 - 1,96 (3H, m), 2,45 - 2,53 (2H, m), 2,80 - 2,93 (2H, m), 3,57 (1H, br d), 4,14 (2H, q), 4,58 (2H, s), 5,15 (1H, s), 6,26 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,86 (1H, d), 6,95 (1H, dd), 7,15 (1H, d). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 447.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



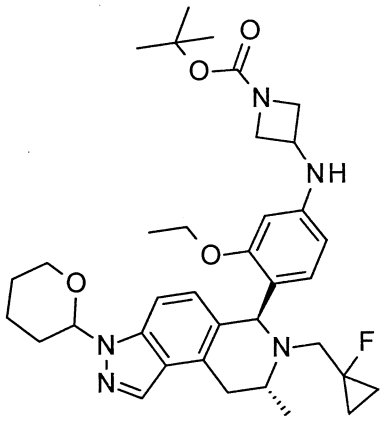
Bổ sung từng giọt natri nitrit (0,039 g, 0,56 mmol) dưới dạng dung dịch trong nước (0,750 ml) vào dung dịch đã được làm nguội của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-2-((1-floxyclopropyl)metyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (0,240 g, 0,54 mmol) trong axit propionic (3,0 ml) ở nhiệt độ -15°C, và duy trì phản ứng trong điều kiện này trong thời gian 1 giờ. Sau đó bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (10 ml), sau đó là từng phần $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (15 ml). Khi hoàn thành việc bổ sung và sự thoát khí ngừng lại, các lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (x2), và chiết các lớp nước kết hợp bằng EtOAc (x2). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký nhanh, građien rửa giải từ 20 đến 60% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,145 g, 59%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (500MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,45 (1H, br s), 0,57 (1H, br s), 0,83 - 0,98 (2H, m), 1,00 (3H, d), 1,37 (3H, t), 2,54 - 2,63 (1H, m), 2,87 - 3,00 (2H, m), 3,27 - 3,32 (1H, m), 3,74 (1H, br d), 4,13 - 4,23 (2H, m), 5,32 (1H, s), 6,67 (1H, d), 6,94 (1H, s), 6,96 - 6,99 (1H, m), 7,19 (1H, d), 7,22 (1H, d), 8,06 (1H, s), 12,96 (1H, s). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 458.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



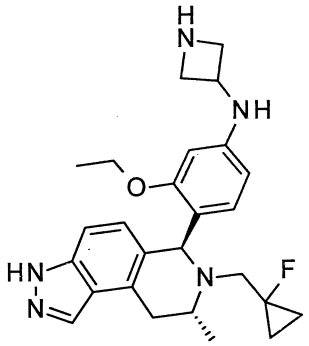
Bổ sung DCM (3 ml) và 3,4-đihyđro-2H-pyran (35,8 mg, 0,43 mmol) vào bình thót cổ đã nạp (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (130 mg, 0,28 mmol) và axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (10,79 mg, 0,06 mmol). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Rửa phản ứng bằng bão hòa trong nước natri hyđro cacbonat, và làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế gôm màu nâu thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 5 đến 40% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (147 mg, 96%) dưới dạng màng khô. ^{1}H NMR (500MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,42 - 0,51 (2H, m), 0,94 - 1,03 (2H, m), 1,07 - 1,12 (3H, m), 1,49 (3H, t), 1,61 - 1,68 (1H, m), 1,73 - 1,79 (2H, m), 2,02 - 2,10 (1H, m), 2,12 - 2,20 (1H, m), 2,53 - 2,63 (2H, m), 2,93 (1H, dt), 3,10 (1H, ddd), 3,38 - 3,46 (1H, m), 3,65 - 3,77 (1H, m), 3,83 - 3,92 (1H, m), 4,00 - 4,07 (1H, m), 4,12 - 4,19 (2H, m), 5,43 (1H, s), 5,66 (1H, ddd), 6,81 (1H, d), 6,89 - 6,93 (1H, m), 6,95 - 7,00 (1H, m), 7,03 - 7,06 (1H, m), 7,25 (1H, dd), 8,03 (1H, s). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 542.

Điều chế *tert*-butyl 3-((3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat



Bổ sung đioxan (2,7 ml) vào bình thót cổ đã nạp (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-etoxyphenyl)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (140 mg, 0,26 mmol), Cs_2CO_3 (168 mg, 0,52 mmol) và *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (67 mg, 0,39 mmol). Làm bay hơi bình thót cổ phản ứng và nhồi bằng N_2 (x3). Bổ sung tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (23 mg, 0,030 mmol), và làm bay hơi bình thót cổ và nhồi bằng nitơ (x3). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 1 giờ và sau đó ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 44 giờ. Làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế gôm thu được bằng sắc ký nhanh, građien rửa giải từ 30 đến 100% etyl axetat trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (86 mg, 53%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (500MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,39 - 0,49 (2H, m), 0,87 - 0,95 (2H, m), 1,06 (3H, d), 1,38 - 1,45 (12H, m), 1,57 - 1,62 (1H, m), 1,68 - 1,74 (2H, m), 1,98 - 2,06 (1H, m), 2,07 - 2,15 (1H, m), 2,49 - 2,63 (2H, m), 2,85 (1H, dt), 3,05 (1H, br t), 3,29 - 3,35 (1H, m), 3,63 - 3,73 (3H, m), 3,75 - 3,83 (1H, m), 3,92 (1H, br d), 3,99 (1H, br d), 4,05 (2H, q), 4,14 (1H, br dd), 4,18 - 4,26 (2H, m), 5,33 (1H, s), 5,58 - 5,63 (1H, m), 5,90 (1H, br d), 6,02 - 6,06 (1H, m), 6,76 (1H, dd), 6,80 (1H, d), 7,19 (1H, d), 7,97 (1H, s). *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 634.

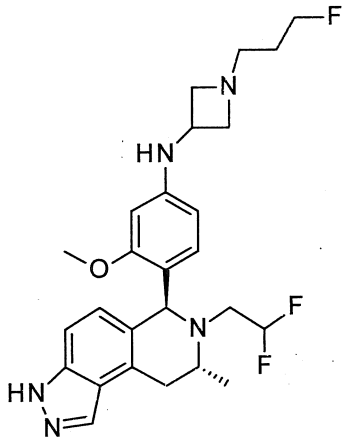
Điều chế *N*-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung metanol (0,5 ml) vào bình thót cổ đã nạp *tert*-butyl 3-((3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (0,080 g, 0,13 mmol). Bổ sung axit clohyđric trong đioxan (4 M; 0,5 ml, 2 mmol), và tiếp tục khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng cách sử dụng hộp chứa SCX-2 mà đã được xử lý sơ bộ bằng metanol, rửa giải trước hết bằng metanol và sau đó bằng amoniac trong metanol (3N), để thu được *N*-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (0,057 g, 99%) dưới dạng chất rắn. ^{1}H NMR (500MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 0,44 - 0,55 (2H, m), 0,90 - 1,00 (2H, m), 1,12 (3H, d), 1,45 (3H, t), 2,61 - 2,71 (1H, m), 2,92 (1H, br dd), 3,10 (1H, br dd), 3,40 (1H, br dd), 3,51 - 3,58 (2H, m), 3,83 - 3,90 (1H, m), 3,91 - 4,02 (2H, m), 4,03 - 4,16 (3H, m), 4,36 (1H, sxt), 5,38 (1H, s), 5,98 (1H, dd), 6,12 (1H, br d), 6,77 - 6,89 (2H, m), 7,13 (1H, d), 8,07 (1H, s), 10,09 (1H, br s). Một H không được quan sát thấy và dường như bị che khuất bởi nước đỉnh. *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 450.

Ví dụ 21

Điều chế N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin



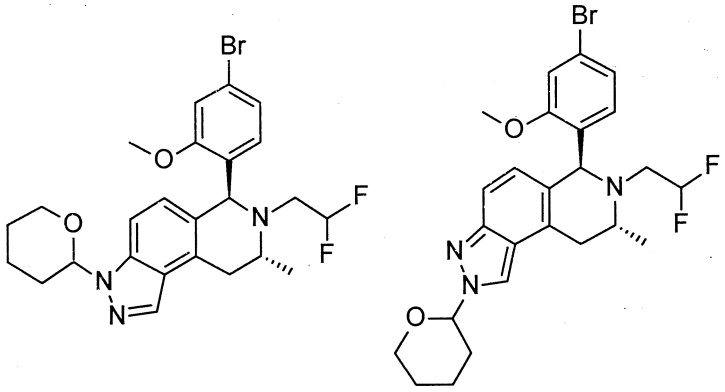
Bổ sung từng giọt axit clohyđric trong đioxan (4 M; 1,23 ml, 5,2 mmol) vào dung dịch có khuấy của *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenylamino)azetiđin-1-carboxylat (316 mg, 0,52 mmol) trong MeOH (5 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Cô phản ứng dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được trong MeOH. Bổ sung nhựa độ rỗng lớn tetraalkylamoni cacbonat dư (Aldrich; mắt lưới 18-50; tải lượng 2,5-3,5 mmol/g N), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. Lọc hỗn hợp, và làm khô dịch lọc trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin thô dưới dạng gôm (220 mg). Sử dụng nguyên liệu này trực tiếp được trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. *m/z* : (ES+), [M+H]+ = 428.

Khuấy hỗn hợp của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin (220 mg, 0,51 mmol), 1-flo-3-iođopropan (106 mg, 0,57 mmol), và DIPEA (0,270 ml, 1,54 mmol) trong DMF (5 ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng amoni clorua bão hòa trong nước. Chiết lớp nước bằng DCM, và làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng HPLC điều chế (cột Xbridge C18, 19 mm x 150 mm; 5 µm; tốc độ dòng chảy: 20 ml/phút), rửa giải bằng từ 40 đến 80% axetonitril trong nước chứa amoni hyđroxit 0,2%. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng SFC

điều chế (cột 2-etylpyriđin, 19 mm x 150 mm, 5 µm; tốc độ dòng chảy: 75 ml/phút; nhiệt độ cột : 40°C; áp suất đầu ra: 100 bar), rửa giải bằng metanol 15% chứa 0,2% amoni hyđroxit trong carbon đioxit, để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (82 mg, 33% hai bước) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,03 (3H, d), 1,55 - 1,74 (2H, m), 2,41 - 2,47 (2H, m), 2,53 - 2,83 (4H, m), 2,86 - 3,04 (1H, m), 3,10 (1H, br dd), 3,32 - 3,43 (1H, m), 3,58 - 3,66 (2H, m), 3,82 (3H, s), 3,86 - 3,98 (1H, m), 4,45 (2H, dt), 5,21 (1H, s), 5,89 (1H, t), 5,90 (1H, dd), 6,01 (1H, d), 6,19 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,67 (1H, d), 7,19 (1H, d), 8,03 (1H, s), 12,92 - 12,96 (1H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 488.

Điều chế nguyên liệu bắt đầu *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat theo các quy trình sau đây.

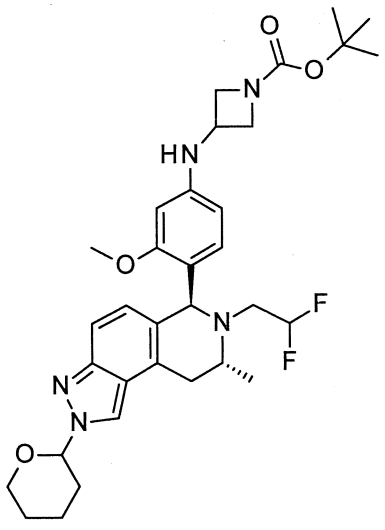
Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Nạp vào lọ vi sóng (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (986 mg, 2,26 mmol), axit 4-metylbenzensulfonic hyđrat (43 mg, 0,23 mmol), 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,31 ml, 3,4 mmol) và DCM. Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong điều kiện vi sóng (300 W) trong thời gian 20 phút. Sau đó làm nguội phản ứng và pha loãng

bằng DCM trước khi được rửa bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước. Các lớp được tách riêng, và làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 70% EtOAc trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin rửa giải nhanh hơn (457 mg, 39%) dưới dạng chất rắn màu da cam. ^{1}H NMR (300MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,04 - 1,22 (3H, m), 1,59 - 1,86 (3H, m), 2,04 - 2,23 (2H, m), 2,53 - 3,31 (5H, m), 3,40 - 3,57 (1H, m), 3,68 - 3,79 (1H, m), 3,97 (3H, s), 4,00 - 4,09 (1H, m), 5,41 (1H, br s), 5,69 (1H, br s), 5,66 - 5,73 (1H, m), 6,67 (1H, dd), 6,80 (1H, dd), 6,92 (1H, dd), 7,06 - 7,12 (1H, m), 7,29 - 7,37 (1H, m), 8,03 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 612. Cũng được phân lập là (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin rửa giải chậm hơn (627 mg, 57%) dưới dạng bột màu be. ^{1}H NMR (300MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,12 (3H, br d), 1,64 - 1,87 (3H, m), 2,03 - 2,17 (1H, m), 2,18 - 2,29 (2H, m), 2,61 - 2,83 (2H, m), 2,89 - 3,15 (2H, m), 3,43 (1H, br s), 3,75 - 3,86 (1H, m), 3,95 (3H, s), 4,13 - 4,20 (1H, m), 5,32 (1H, s), 5,79 (1H, br t), 5,66 - 5,73 (1H, m), 6,63 - 6,77 (2H, m), 6,93 (1H, d), 7,09 (1H, d), 7,43 (1H, d), 8,14 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 612.

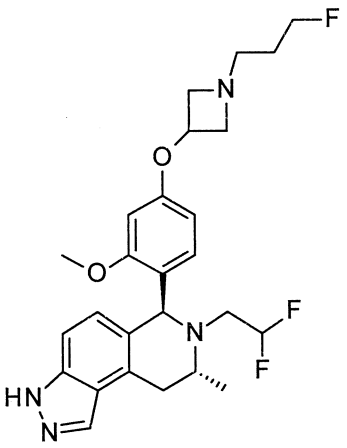
Điều chế *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenylamino)azetiđin-1-carboxylat



Nạp vào lọ vi sóng (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (310 mg, 0,60 mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (154 mg, 0,89 mmol), Cs_2CO_3 (388 mg, 1,19 mmol), và tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (54,0 mg, 0,06 mmol). Khử khí lọ và nhồi bằng nitơ (x2). Khử khí lọ lại và nhồi lại bằng 1,4-đioxan (6 ml) và nitơ. Khử khí lọ lại và nhồi lại bằng nitơ. Gia nhiệt hỗn hợp trong điều kiện vi sóng (300W, 110°C) trong thời gian 3,5 giờ. Pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng natri hyđrocarbonat bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 20 đến 60% EtOAc trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-2-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-2*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenylamino)azetiđin-1-carboxylat (322 mg, 88%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ. ^{1}H NMR (300MHz, CLOROFORM-*d*, 27°C) 1,08 (3H, br d), 1,39 - 1,43 (9H, m), 1,58 - 1,81 (3H, m), 2,06 (1H, br dd), 2,13 - 2,25 (2H, m), 2,58 - 2,71 (1H, m), 2,82 - 3,11 (2H, m), 3,34 - 3,50 (1H, m), 3,66 - 3,81 (3H, m), 3,86 (3H, s), 3,90 - 4,01 (1H, m), 4,08 - 4,20 (3H, m), 4,19 - 4,29 (2H, m), 5,22 (1H, s), 5,76 (1H, t), 5,64 (1H, t), 5,88 (1H, br d), 6,09 (1H, d), 6,59 (1H, br t), 6,67 (1H, d), 7,37 (1H, br d), 8,08 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 612.

Ví dụ 22

Điều chế (6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung từng giọt HCl trong đioxan (4 M; 1,02 ml, 4,08 mmol) vào dung

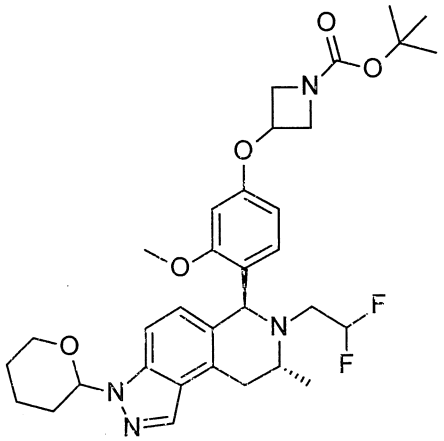
dịch có khuấy của *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat (250 mg, 0,41 mmol) trong MeOH (4 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau đó cô phản ứng dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được với MeOH. Bổ sung nhựa độ rỗng lớn tetraalkylamoni cacbonat dư (Aldrich; mắt lưới 18-50; tải lượng 2,5-3,5 mmol/g N), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút trước khi làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (179 mg) thô, mà được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. *m/z*: ES+ [M+H]+ 429.

Khuấy hỗn hợp của (6*S*,8*R*)-6-(4-(azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (178 mg, 0,42 mmol), 1-flo-3-iođopropan (94 mg, 0,50 mmol), và DIPEA (0,218 ml, 1,25 mmol) trong DMF (4 ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Sau đó pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng amoni clorua bão hòa trong nước. Các lớp được tách riêng, và chiết lớp nước bằng DCM. Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng SFC điều chế (cột 2-etylpyriđin; 19 mm x 150 mm; 5µm; tốc độ dòng chảy: 75 ml/phút; nhiệt độ cột: 40°C; áp suất đầu ra: 100 bar), rửa giải với (metanol chứa amoni hyđroxit 0,2%) 15% trong carbon đioxit để thu được (6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (70 mg, 35% qua hai bước) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,02 (3H, d), 1,61 - 1,84 (2H, m), 2,55 - 2,84 (3H, m), 2,90 - 3,13 (2H, m), 3,18 - 3,43 (4H, m), 3,87 (3H, s), 3,89 - 4,00 (2H, m), 4,45 (2H, dt), 4,81 (1H, quin), 5,28 (1H, s), 5,74 - 6,16 (1H, m), 6,19 (1H, dd), 6,49 - 6,54 (2H, m), 6,66 (1H, d), 7,21 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,98 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 489.

Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-

carboxylat được mô tả dưới đây.

Điều chế *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat

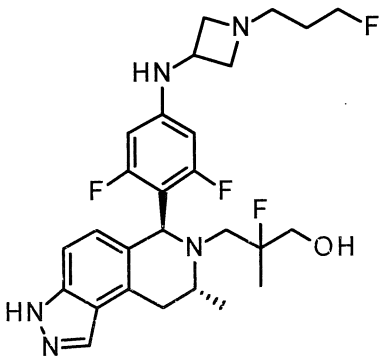


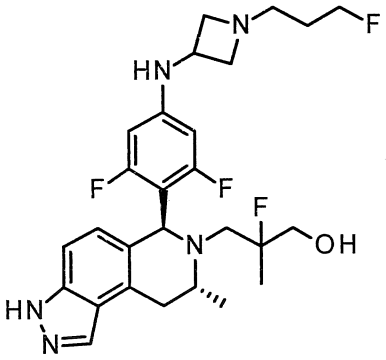
Nạp vào lọ vi sóng (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (259 mg, 0,50 mmol), *tert*-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat (259 mg, 1,49 mmol), xesi cacbonat (324 mg, 1,00 mmol), và chất tiền xúc tác thế hệ thứ 3 RockPhos (42 mg, 0,050 mmol). Làm bay hơi lọ và nhồi lại bằng nitơ (x2). Sau đó làm bay hơi lọ và nhồi lại bằng toluen (3 ml). Làm bay hơi lọ và nhồi lại bằng nitơ. Gia nhiệt hỗn hợp ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 4 giờ. Pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 60% EtOAc trong hexan để thu được *tert*-butyl 3-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenoxy)azetiđin-1-carboxylat (220 mg, 72%) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu trắng. ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6, 100°C) 1,03 - 1,09 (3H, m), 1,40 (9H, s), 1,56 - 1,64 (2H, m), 1,67 - 1,84 (1H, m), 1,93 - 2,01 (1H, m), 2,02 - 2,12 (1H, m), 2,34 - 2,46 (1H, m), 2,59 - 2,74 (1H, m), 2,84 (1H, dt), 2,93 - 3,06 (1H, m), 3,13 - 3,23 (1H, m), 3,40 - 3,50 (1H, m), 3,65 - 3,74 (1H, m), 3,76 - 3,84 (2H, m), 3,84 - 3,91 (4H, m), 4,21 - 4,28 (2H, m), 4,97 (1H, tt), 5,33 (1H, s), 5,67 - 6,00 (1H, m), 5,74 (1H, dd), 6,23 (1H, ddd), 6,54 (1H, d), 6,66 (1H, t), 6,73 (1H,

d), 7,35 (1H, d), 8,04 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 613.

Các ví dụ 23 và 24

Điều chế các chất đồng phân lập thể không đối quang riêng lẻ của 3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-ylamino)phenyl)-8-metyl-8,9-đihyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-7(6*H*)-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-ol





Bổ sung từng giọt tetrabutylamoni florua trong THF (1 M; 0,114 ml, 0,11 mmol) được qua bơm tiêm vào dung dịch có khuấy của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (82 mg, 0,08 mmol) trong THF (0,75 ml). Sau 2,5 giờ bổ sung thêm tetrabutylamoni florua trong THF (1 M; 0,08 ml, 0,08 mmol) và khuấy phản ứng trong 18 giờ nữa. Pha loãng phản ứng bằng DCM và rửa liên tục bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước và natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên $MgSO_4$, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải MeOH từ 0,5 đến 10% trong DCM. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm và tinh chế phần cặn thu được thêm bằng HPLC điều chế (cột Waters XBridge Prep C18 OBD, 5µm silic oxit, đường kính 19 mm, chiều dài 150 mm), bằng cách sử dụng gradien rửa giải từ 45 đến 85% axetonitril trong (nước chứa 0,2% NH_4OH). Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm để thu được chất đồng phân rửa giải thứ nhất 1 (2,7 mg, 7%) và chất đồng phân rửa giải thứ hai (2,1 mg, 5%) của 3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-ylamino)phenyl)-8-metyl-8,9-đihyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-7(6*H*)-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-ol dưới dạng màng màu vàng nhạt.

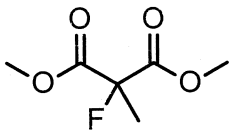
Chất đồng phân 1: 1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2, 27°C) 1,13 (3H, d), 1,17 (3H, d),

1,66 - 1,78 (3H, m), 2,54 (2H, t), 2,69 (1H, dd), 2,81 - 2,94 (3H, m), 3,00 (1H, dd), 3,31 (1H, dd), 3,51 - 3,59 (1H, m), 3,60 - 3,71 (4H, m), 3,95 - 4,03 (1H, m), 4,38 (1H, br s), 4,46 (2H, dt), 5,26 (1H, s), 6,01 (2H, br d), 6,84 (1H, d), 7,21 (1H, d), 8,03 (1H, s), 10,19 (1H, br s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 520.

Chất đồng phân 2: 1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2, 27°C) 1,05 (3H, d), 1,09 (3H, d), 1,65 - 1,80 (2H, m), 2,54 (2H, t), 2,62 (1H, dd), 2,83 - 2,88 (2H, m), 2,91 - 3,00 (1H, m), 3,13 - 3,24 (1H, m), 3,33 - 3,46 (2H, m), 3,48 - 3,58 (1H, m), 3,66 (2H, q), 3,96 - 4,04 (2H, m), 4,40 (1H, dt), 4,41 - 4,53 (2H, m), 4,64 (1H, br d), 5,03 (1H, s), 6,06 (2H, br d), 6,76 (1H, d), 7,19 (1H, d), 8,03 (1H, s), 10,19 (1H, br s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 520.

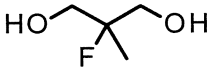
Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin được mô tả dưới đây.

Điều chế đimetyl 2-flo-2-metyl-propanđioat



Bổ sung natri hyđrua (dịch phân tán 60% trong dầu khoáng; 2,93 g, 73,3 mmol) vào dung dịch của đimetyl 2-flomalonat (10,0 g, 66,6 mmol) trong THF (218 ml) có khuấy mạnh. Sau 30 phút bổ sung iođometan (4,56 ml, 73,3 mmol). Khuấy phản ứng trong 3 giờ nữa. Dập tắt phản ứng bằng nước và sau đó chiết bằng EtOAc (4 x 100 ml). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được đimetyl 2-flo-2-metyl-propanđioat (8,4 g, 77%) dưới dạng dầu màu da cam. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,72 (3H, d), 3,77 (6H, s).

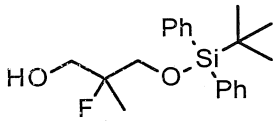
Điều chế 2-flo-2-metylpropan-1,3-điol



Bổ sung từng phần lithi nhôm hyđrua (4,50 g, 112,6 mmol) vào dung dịch có khuấy của đimetyl 2-flo-2-metyl-propanđioat (8,40 g, 51,2 mmol) trong THF

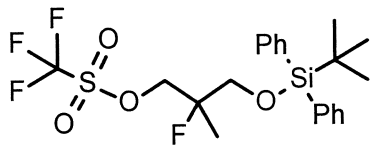
(205 ml) ở nhiệt độ 0°C. Để phản ứng ấm lên nhiệt độ trong phòng và khuấy trong điều kiện này trong thời gian 1 giờ. Sau đó làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống 0°C và dập tắt cẩn thận bằng cách bổ sung tuần tự từng giọt nước (5,85 ml), NaOH 15 % theo khối lượng trong nước (5,85 ml), và nước (18 ml). Khuấy huyền phù gelatin thu được nhanh trong thời gian 1 giờ. Loại bỏ chất kết tủa bằng cách lọc, và cô dịch lọc dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong hỗn hợp của $CHCl_3$/IPA (3:1), làm khô trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được 2-flo-2-metylpropan-1,3-điol (3,28 g, 46%) dưới dạng dầu màu da cam. Dầu này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,18 (3H, d), 3,42 (4H, dd), 4,80 (2H, t).

Điều chế 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropan-1-ol



Bổ sung natri hyđrua (dịch phân tán 60% trong dầu khoáng; 1,1 g, 27,5 mmol) vào dung dịch có khuấy của 2-flo-2-metylpropan-1,3-điol (2,7 g, 25 mmol) trong THF (93 ml) ở nhiệt độ 0°C và khuấy phản ứng trong thời gian 1 giờ. Bổ sung *tert*-butylclođiphenylsilan (6,5 ml, 25 mmol), và khuấy phản ứng trong 1 giờ nữa. Dập tắt phản ứng bằng nước, các lớp được tách riêng, và chiết lớp nước bằng EtOAc (2 x 100 ml). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc, và hấp thụ trên silicagel dưới áp suất giảm. Tinh chế bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% EtOAc trong hexan, thu được 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropan-1-ol (4,4 g, 51%) dưới dạng gôm trong. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (9H, s), 1,27 (3H, d), 3,48 (1H, dd), 3,53 (1H, dd), 3,66 (1H, d), 3,73 (1H, br s), 4,93 (1H, t), 7,40 - 7,48 (6H, m), 7,59 - 7,66 (4H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 347.

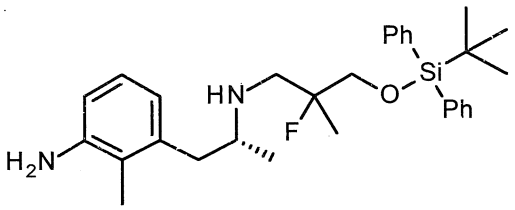
Điều chế 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat



Bổ sung từng giọt triflometansulfonic anhyđrit (1,3 ml, 7,6 mmol) vào

dung dịch có khuấy của 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropan-1-ol (2,2 g, 6,35 mmol) và 2,6-đimetylpyriđin (1,28 ml, 7,6 mmol) trong DCM (22 ml) ở nhiệt độ -10°C (bể muối/nước đá). Duy trì phản ứng trong điều kiện này trong thời gian 1,5 giờ. Sau đó pha loãng phản ứng bằng DCM (100 ml) và rửa liên tục bằng HCl trong nước (1N), $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, và NaCl bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được 3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (3,2 g) dưới dạng dầu màu đỏ. Dầu này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm.

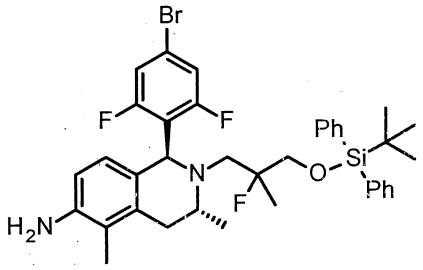
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của 3-((2*R*)-2-((3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)amino)propyl)-2-metylanilin



Bổ sung 3-((*Tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl triflometansulfonat (3,04 g, 6,35 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (1,04 g, 6,35 mmol) và điisopropyletylamin (1,65 ml, 9,53 mmol) trong 1,4-đioxan (24 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 18 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng DCM (250 ml) và rửa bằng nước. Chiết lớp nước bằng DCM (2 x 100 ml), và làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải MeOH từ 0 đến 25% trong DCM. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm để thu được 3-((2*R*)-2-((3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (2,10 g, 95%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,90 (3H, dd), 1,01 (9H, d), 1,29 (3H, dd), 1,41 (1H, br s), 1,97 (3H, d), 2,29 - 2,43 (1H, m), 2,65 - 2,91 (4H, m), 3,62 - 3,82 (2H, m), 4,67 (2H, s), 6,28 - 6,36 (1H, m), 6,47 (1H, dd), 6,69 - 6,81 (1H, m), 7,40 - 7,52 (6H, m), 7,61 - 7,69 (4H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 494.

Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-

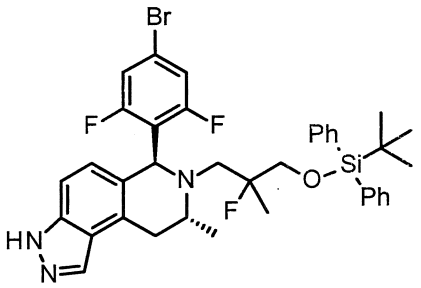
2,6-điflophenyl)-2-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 4-bromo-2,6-điflobenzalđehyt (628 mg, 2,84 mmol) vào dung dịch có khuấy của 3-((2*R*)-2-((3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)amino)propyl)-2-metylanilin (700 mg, 1,42 mmol) và nước (0,128 ml, 7,10 mmol) trong hỗn hợp của axit axetic (10 ml) và toluen (4 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 18 giờ trước khi gia nhiệt ở điều kiện hồi lưu trong 4 giờ nữa. Để phản ứng nguội và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong DCM và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Chiết pha nước bằng DCM (20 ml) và cô các lớp hữu cơ kết hợp dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn trong hỗn hợp của MeOH/DCM (5:1, 18 ml) và sau đó bổ sung hyđroxylamin hyđroclorua (148 mg, 2,13 mmol) và natri axetat (233 mg, 2,84 mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 5 phút và sau đó cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong EtOAc và rửa tuần tự bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước và NaCl bão hòa trong nước trước khi làm khô trên $MgSO_4$, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 35% EtOAc trong hexan để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (339 mg, 34%) dưới dạng màng màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,05 (9H, d), 1,19 (3H, dd), 2,08 (3H, s), 2,35 (1H, dd), 2,47 - 2,67 (2H, m), 2,84 - 3,01 (1H, m), 3,02 - 3,14 (1H, m), 3,22 (1H, dd), 3,40 - 3,63 (3H, m), 3,66 - 3,79 (1H, m), 3,92 (1H, dd), 5,15 (1H, d), 6,38 - 6,47 (2H, m), 6,83 (1H, d), 6,93 - 7,00 (1H, m), 7,38 - 7,49 (6H, m), 7,59 - 7,71 (4H, m), 8,69 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 695.

Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-

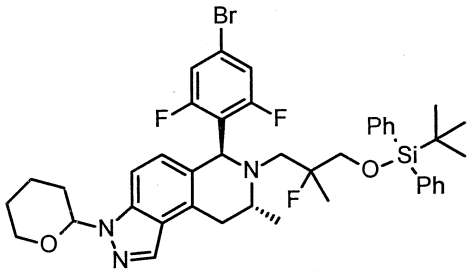
metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung từng giọt natri nitrit (33,6 mg, 0,49 mmol) dưới dạng dung dịch trong nước (0,400 ml) vào dung dịch đã được làm nguội của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-2-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (339 mg, 0,49 mmol) trong axit propionic (4 ml) ở nhiệt độ -20°C, và khuấy phản ứng trong thời gian 30 phút trong điều kiện này. Bổ sung EtOAc lạnh như nước đá (20 ml) sau đó là bổ sung từng phần $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (5 ml). Khuấy mạnh hỗn hợp hai pha này và trung hòa bằng cách bổ sung từ từ Na_2CO_3 rắn. Các pha được tách riêng, và rửa các lớp hữu cơ bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (2 x 30 ml) và NaCl bão hòa trong nước (30 ml) trước khi làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 40% EtOAc trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (206 mg, 60%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,98 (4,5H, s), 1,00 (1,5H, d), 1,02 (1,5H, d), 1,04 (4,5H, s), 1,15 (1,5H, d), 1,23 (1,5H, d), 2,30 - 2,47 (0,5H, m), 2,60 (0,5H, dd), 2,81 (0,5H, dd), 2,89 (0,5H, dd), 3,02 (0,5H, dd), 3,06 - 3,21 (1H, m), 3,22 - 3,33 (0,5H, m), 3,37 - 3,51 (1H, m), 3,51 - 3,60 (0,5H, m), 3,61 - 3,72 (0,5H, m), 3,73 - 3,83 (0,5H, m), 3,89 (0,5H, dd), 5,22 (0,5H, s), 5,27 (0,5H, s), 6,70 (1H, dd), 6,81 (1H, br d), 6,91 - 7,00 (1H, m), 7,14 (1H, t), 7,33 - 7,47 (6H, m), 7,55 - 7,67 (4H, m), 8,07 (1H, br d). Inđazol NH không được quan sát thấy. *m/z*: ES+ [M+H]+ 706.

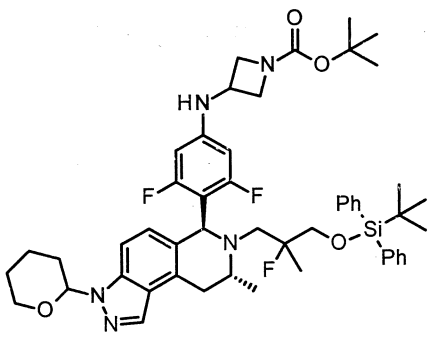
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-

f]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,129 ml, 1,41 mmol) và axit *para*-toluensulfonic monohyđrat (2,7 mg, 0,01 mmol) vào dung dịch có khuấy của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (200 mg, 0,28 mmol) trong DCM (2 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 21 giờ. Để phản ứng nguội và sau đó được pha loãng bằng DCM, rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 30% EtOAc trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (176 mg, 79%) dưới dạng màng không màu. *m/z*: ES+ [M+H]+ 790.

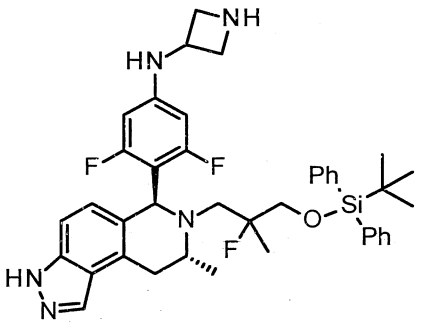
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat



Nạp vào lọ với thanh khuấy, (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2,6-điflophenyl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (126 mg, 0,16

mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (41 mg, 0,24 mmol), Pd_2dba_3 (9,3 mg, 0,01 mmol), 4,5-bis(điphenylphosphino)-9,9-đimetylxanthen (Xantphos) (16 mg, 0,02 mmol), và xesi cacbonat (156 mg, 0,48 mmol). Bịt kín lọ, làm bay hơi và làm đầy lại bằng nitơ (3x) trước khi bổ sung 1,4-đioxan (1 ml) thông qua bơm tiêm. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 phút và sau đó gia nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 16 giờ. Để hỗn hợp nguội và sau đó pha loãng bằng EtOAc, lọc qua đất điatomit, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 40% EtOAc trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((4-(((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (95 mg, 68%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. *m/z*: ES+ [M+H]+ 883.

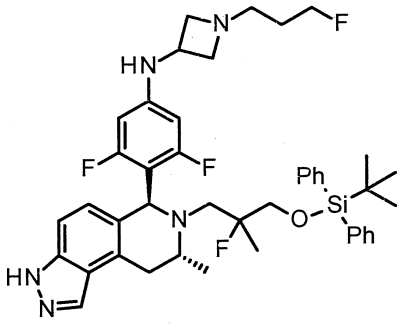
Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của *N*-(4-(((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)azetiđin-3-amin



Bổ sung axit formic (0,5 ml, 13,04 mmol) vào *tert*-butyl 3-((4-(((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (53 mg, 0,06 mmol) và khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 18 giờ. Cô phản ứng dưới áp suất giảm, và hòa tan phần cặn thu được trong THF (0,5 ml) và xử lý bằng NaOH trong nước (5N; 0,081 ml, 2,40 mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 20 giờ và sau đó duy trì ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 4 giờ. Bổ sung thêm NaOH trong nước (5N; 0,081 ml, 2,40 mmol), và phản ứng khuấy ở nhiệt độ 40°C

trong thời gian 46 giờ trước khi gia nhiệt ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 5 giờ. Để cho hỗn hợp phản ứng nguội xuống nhiệt độ môi trường xung quanh. Trong khi đó, trong lọ riêng rẽ, bổ sung HCl trong đioxan (4N; 0,38 ml, 1,5 mmol) vào dung dịch có khuấy của *tert*-butyl 3-((4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)amino)azetiđin-1-carboxylat (89 mg, 0,10 mmol) trong MeOH (0,5 ml). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ và sau đó cô dưới áp suất giảm. Kết hợp phần cặn thu được với phản ứng trước (dưới dạng hỗn hợp trong NaOH trong nước (5N) và THF). Pha loãng hỗn hợp mới bằng DCM (5 ml), các pha được tách riêng, và chiết pha nước bằng DCM (2 x 5 ml). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên $MgSO_4$, lọc và cô dưới áp suất giảm để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)azetiđin-3-amin (177 mg) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt, mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. *m/z*: ES+ [M+H]+ 698.

Điều chế hỗn hợp đồng phân lập thể không đối quang của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin

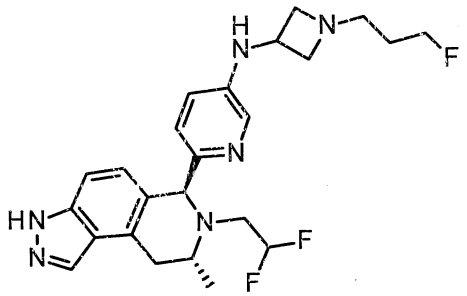


Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (0,026 ml, 0,16 mmol) vào dung dịch có khuấy của *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)azetiđin-3-amin (115 mg, 0,16 mmol) và điisopropyletylamin (0,058 ml, 0,33 mmol) trong NMP (0,75 ml). Khuấy phản ứng trong thời gian 16 giờ ở

nhiệt độ trong phòng trước khi pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước. Các lớp được tách và chiết lớp nước bằng EtOAc. Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng NaCl bão hòa trong nước (2 x 5 ml), làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 1 đến 20% MeOH trong DCM để thu được *N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)-2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3,5-diflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetidin-3-amin (82 mg, 66%) dưới dạng màng màu vàng nhạt. *m/z*: ES+ [M+H]+ 758.

Ví dụ 25

Điều chế 6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetidin-3-yl)pyridin-3-amin



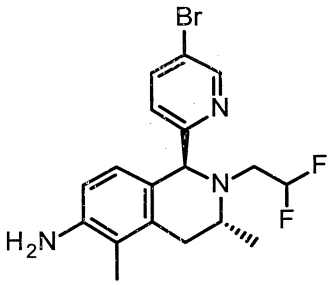
Bổ sung từng giọt HCl trong đioxan (4N; 0,86 ml, 3,4 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-8-metyl-3-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyridin-3-yl)amino)azetidin-1-carboxylat (0,20 g, 0,34 mmol) trong MeOH (2,5 ml), và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Cô phản ứng dưới áp suất giảm để thu được *N*-(azetidin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyridin-3-amin hydroclorua (200 mg) dưới dạng chất rắn. *m/z:* (ES+), [M+H]+ 399.

Bổ sung tuần tự DMF (0,5 ml) và 1-flo-3-iodopropan (0,036 ml, 0,34 mmol) ở nhiệt độ môi trường. Sau đó bổ sung từng giọt diisopropyletylamin dư (1,2 ml, 6,80 mmol). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ và sau đó cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký C18 nhanh pha đảo, gradien rửa giải từ 20 đến 75% axetonitril trong (nước chứa 0,2% NH_4OH),

để thu được 6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (45 mg, 29%) dưới dạng chất rắn. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,04 (3H, d), 1,60 - 1,75 (2H, m), 2,51 - 2,70 (3H, m), 2,79 - 2,96 (3H, m), 3,03 (1H, dd), 3,13 (1H, br dd), 3,41 - 3,53 (1H, m), 3,74 (2H, br s), 3,98 (1H, br d), 4,45 (2H, dt), 4,86 (1H, s), 5,83 (1H, tt), 6,26 (1H, d), 6,74 (1H, d), 6,81 (1H, dd), 6,96 (1H, d), 7,18 (1H, d), 7,76 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,95 (1H, s). *m/z:* (ES+), [M+H]+ 459.

Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)amino)azetiđin-1-carboxylat được mô tả dưới đây.

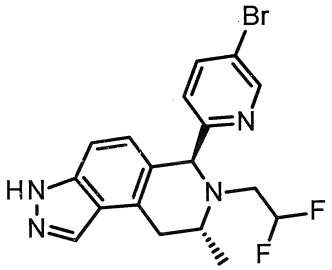
Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(2,2-đifloetyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



Bổ sung 5-bromopicolinalđehyt (2,74 g, 14,7 mmol) vào dung dịch của (*R*)-3-(2-((2,2-đifloetyl)amino)propyl)-2-metylanilin (1,6 g, 7,0 mmol) trong axit axetic (34,4 ml) và nước (0,631 ml, 35,0 mmol). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 3 giờ và sau đó cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong MeOH (40 ml) và bổ sung natri axetat (1,15 g, 14,0 mmol) và hyđroxylamin hyđroclorua (0,730 g, 10,5 mmol). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ và sau đó cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn trong nước, trung hòa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, và sau đó chiết bằng EtOAc. Cô các lớp hữu cơ kết hợp dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 90% EtOAc trong hexan. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được thêm bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 90% EtOAc

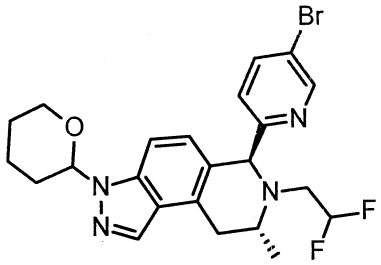
trong hexan, để thu được (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(2,2-đifloetyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (1,40 g, 49%) dưới dạng gôm. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,99 (3H, d), 1,93 (3H, s), 2,38 - 2,47 (1H, m), 2,51 - 2,62 (1H, m), 2,72 (1H, dd), 2,92 - 3,14 (1H, m), 3,23 - 3,29 (1H, m), 4,65 (2H, s), 4,79 (1H, s), 5,98 (1H, tt), 6,39 (2H, s), 7,22 (1H, d), 7,91 (1H, dd), 8,55 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 396.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



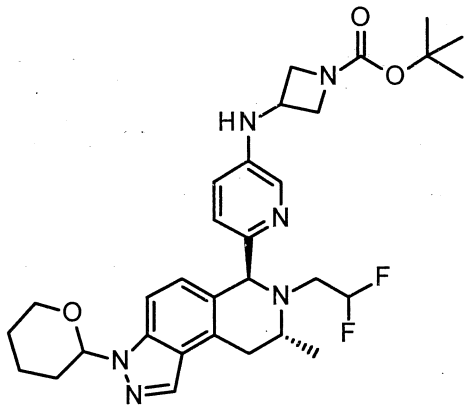
Bổ sung axit axetic (541 mg, 9,01 mmol) vào dung dịch có khuấy của (1*S*,3*R*)-1-(5-bromopyriđin-2-yl)-2-(2,2-đifloetyl)-3,5-đimetyl-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (714 mg, 1,80 mmol) trong $CHCl_3$ (8 ml). Làm nguội phản ứng xuống 0°C, và bổ sung từng giọt dung dịch của isopentyl nitrit (422 mg, 3,60 mmol) trong $CHCl_3$ (1 ml). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 2 giờ và sau đó dập tắt bằng cách bổ sung từ từ dung dịch của $NaHCO_3$ (1,5 g, 18 mmol) trong nước (20 ml). Các pha được tách riêng, và cô lớp hữu cơ dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 5 đến 35% EtOAc trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (438 mg, 60%) dưới dạng chất rắn màu nâu sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,13 (3H, d), 2,68 - 2,85 (1H, m), 2,91 (1H, dd), 2,98 - 3,17 (1H, m), 3,34 (1H, dd), 3,47 - 3,63 (1H, m), 5,05 (1H, s), 5,63 (1H, tt), 6,87 (1H, d), 7,19 (1H, d), 7,28 (1H, d), 7,71 (1H, dd), 8,04 (1H, d), 8,57 (1H, dd). Inđazol NH không được quan sát thấy. *m/z*: ES+ [M+H]+ 405.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



Bổ sung 3,4-đihyđro-2*H*-pyran (0,294 ml, 3,23 mmol) vào dung dịch của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (438 mg, 1,08 mmol) và axit *para*-toluensulfonic monohyđrat (21 mg, 0,11 mmol) trong DCM (4 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 6 giờ trong điều kiện vi sóng (300W). Sau đó để phản ứng nguội và sau đó rửa bằng $NaHCO_3$ bão hòa trong nước, làm khô trên Na_2SO_4, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 10 đến 30% EtOAc trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (441 mg, 83%) dưới dạng chất rắn dạng gôm màu nâu sáng. *m/z*: ES+ [M+H]+ 491.

Điều chế *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)amino)azetiđin-1-carboxylat

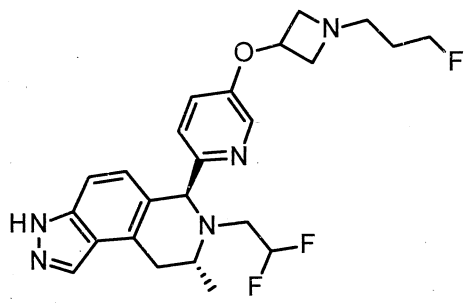


Nạp vào lọ với thanh khuấy, (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,22 g, 0,44 mmol), *tert*-butyl 3-aminoazetiđin-1-carboxylat (0,151 g, 0,88 mmol), xesi cacbonat (0,29 g, 0,88 mmol), và tiền chất

xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (0,040 g, 0,040 mmol). Bịt kín lọ, làm bay hơi, và nhồi bằng nitơ. Bổ sung 1,4-đioxan (4 ml), và làm bay hơi lại lọ và làm đầy lại bằng nitơ. Khuấy phản ứng ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 13 giờ và sau đó cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 10 đến 30% EtOAc trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)amino)azetiđin-1-carboxylat (0,20 g, 78%) dưới dạng chất rắn màu be. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD, 27°C) 1,10 (3H, dd), 1,43 (9H, s), 1,56 - 1,72 (2H, m), 1,72 - 1,87 (1H, m), 1,92 - 1,99 (1H, m), 2,03 - 2,17 (1H, m), 2,38 - 2,53 (1H, m), 2,62 - 2,82 (1H, m), 2,88 - 3,14 (2H, m), 3,33 - 3,44 (1H, m), 3,49 - 3,60 (1H, m), 3,67 - 3,83 (3H, m), 3,92 - 4,02 (1H, m), 4,17 - 4,33 (3H, m), 4,91 (1H, s), 5,34 - 5,57 (1H, m), 5,69 - 5,77 (1H, m), 6,79 (1H, d), 6,89 (1H, dd), 7,05 (1H, dd), 7,34 (1H, d), 7,78 - 7,81 (1H, m), 8,07 (1H, s), anilin NH, không được quan sát thấy. *m/z*: ES+ [M+H]+ 583.

Ví dụ 26

Điều chế (6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin



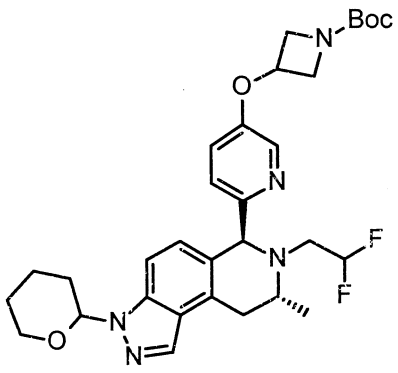
Bổ sung từng giọt HCl trong đioxan (4N; 0,97 ml, 3,9 mmol) vào dung dịch của *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)oxy)azetiđin-1-carboxylat (0,227 g, 0,39 mmol) trong MeOH (3 ml), và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Cô phản ứng dưới áp suất giảm để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-(azetiđin-3-yloxy)pyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin hyđroclorua (0,235 g; số

lượng đượclượng của HCl không được xác định) dưới dạng chất rắn, mà được sử dụng mà không tinh chế thêm. *m/z:* (ES+), [M+H]+ 400.

Bổ sung 1-flo-3-iođopropan (0,041 ml, 0,34 mmol) vào dung dịch có khuấy của (6*S*,8*R*)-6-(5-(azetiđin-3-yloxy)pyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin hyđroclorua (235 mg) trong DMF (0,6 ml) ở nhiệt độ môi trường. Bổ sung từng giọt điisopropyletylamin dư (1,36 ml, 7,80 mmol). Khuấy phản ứng trong thời gian 18 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký C18 nhanh pha đảo, građien rửa giải từ 20 đến 75% axetonitril trong (nước chứa 0,2% NH_4OH). Kết hợp các phân đoạn sản phẩm và làm khô lạnh để thu được (6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (53 mg, 30%) dưới dạng chất rắn. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,05 (3H, d), 1,60 - 1,77 (2H, m), 2,54 - 2,70 (3H, m), 2,85 (1H, dd), 2,97 - 3,22 (4H, m), 3,39 - 3,50 (1H, m), 3,87 (2H, br s), 4,45 (2H, dt), 4,80 - 4,92 (1H, m), 5,00 (1H, s), 5,93 (1H, tt), 6,78 (1H, d), 7,19 - 7,26 (3H, m), 8,05 (1H, s), 8,06 (1H, d), 12,97 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 460.

Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)oxy)azetiđin-1-carboxylat được mô tả dưới đây.

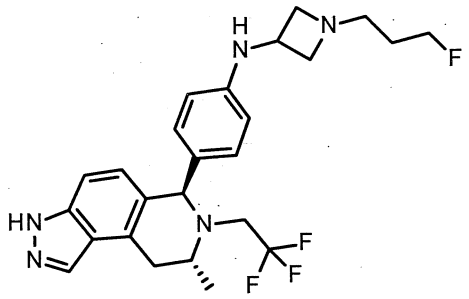
Điều chế *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)oxy)azetiđin-1-carboxylat



Tạo huyền phù *Tert*-butyl 3-hyđroxyazetiđin-1-carboxylat (227 mg, 1,31 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (215 mg, 0,44 mmol), tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 RockPhos (37,1 mg, 0,04 mmol), và xesi cacbonat (285 mg, 0,88 mmol) trong toluen (4 ml) trong lọ vi sóng kín. Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 1 giờ trong điều kiện vi sóng (300W). Cô phản ứng dưới áp suất giảm, và tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 20 đến 60% EtOAc trong hexan, để thu được *tert*-butyl 3-((6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-3-(tetrahyđro-2*H*-pyran-2-yl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-yl)oxy)azetiđin-1-carboxylat (227 mg, 89%) dưới dạng chất rắn. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD, 27°C) 1,11 (3H, dd), 1,41 - 1,43 (9H, m), 1,61 - 1,66 (1H, m), 1,66 - 1,86 (2H, m), 2,04 - 2,17 (1H, m), 2,36 - 2,54 (1H, m), 2,59 - 2,79 (1H, m), 2,89 - 3,02 (1H, m), 3,03 - 3,17 (1H, m), 3,31 - 3,43 (1H, m), 3,48 - 3,60 (1H, m), 3,70 (2H, dd), 3,88 - 3,95 (2H, m), 4,09 - 4,13 (1H, m), 4,27 - 4,39 (2H, m), 4,99 - 5,08 (2H, m), 5,64 (1H, tt), 5,73 (1H, dt), 6,81 (1H, dd), 7,20 (1H, dd), 7,27 (1H, dd), 7,36 (1H, d), 8,04 - 8,10 (2H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 584.

Ví dụ 27

1-(3-flopropyl)-*N*-(4-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin

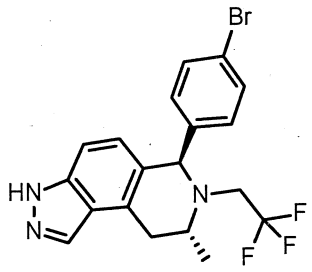


Bổ sung natri *tert*-butoxit (2,118 g, 22,06 mmol) và BrettPhos G3 (0,166 g, 0,18 mmol) vào dung dịch đã khử khí của 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,632 g, 4,78 mmol) và (6*R*,8*R*)-6-(4-bromophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (1,56 g, 3,68 mmol) trong 1,4-đioxan (18,4 ml) và để phản ứng ấm lên 90°C và khuấy qua đêm. Sau khi để nguội, pha

loãng phản ứng bằng EtOAc (20 ml) và nước (20 ml), và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng EtOAc (20 ml), sau đó làm khô và làm bay hơi các chất hữu cơ kết hợp. Tinh chế bằng HPLC (cột Waters CSH C18 OBD, silic oxit 5µ, đường kính 30 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 0,1% NH3 và MeCN làm các chất rửa giải) để tạo ra gôm. Việc này diễn ra trong metanol (5ml), sau đó bổ sung nước (95 ml) và tạo bột nhão hỗn hợp này qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Thu gom chất rắn thu được bằng cách lọc, rửa bằng metanol 5% trong nước và làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm để tạo ra 1-(3-flopropyl)-*N*-(4-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (0,935 g, 54%) dưới dạng chất rắn không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,13 (3H, d), 1,68 - 1,83 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,77 (1H, dd), 2,86 (2H, t), 2,89 - 2,99 (1H, m), 3,04 (1H, dd), 3,15 - 3,26 (1H, m), 3,37 - 3,48 (1H, m), 3,71 - 3,76 (2H, m), 3,93 (1H, d), 4,10 (1H, q), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,99 (1H, s), 6,41 - 6,46 (2H, m), 6,97 (1H, d), 7,00 (2H, d), 7,26 (1H, s), 8,06 (1H, d), 10,10 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 476.

Tổng hợp (6*R*,8*R*)-6-(4-bromophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin dùng làm nguyên liệu bắt đầu như sau:

(6*R*,8*R*)-6-(4-bromophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

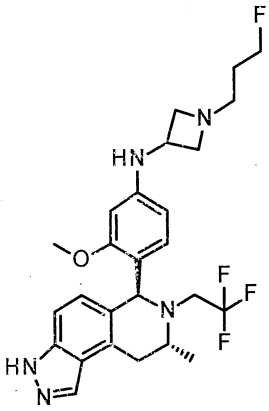


Bổ sung axit trifloaxetic (1,85 ml) vào dung dịch của (*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (2,0 g, 7,77 mmol) và 4-bromobenzalđehyt (7,19 g, 38,9 mmol) trong toluen (37 ml) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 30 giờ. Để phản ứng nguội và phân chia giữa DCM (100 ml) và natri bicacbonat bão hòa trong nước (50 ml). Các lớp được tách riêng và cô lớp hữu cơ trong chân không. Tinh chế bằng sắc ký cột silicagel rửa giải bằng 0-50%

etyl axetat trong heptan để tạo ra (6*R*,8*R*)-6-(4-bromophenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (1,560 g, 47%) dưới dạng bọt, và ở tỉ lệ 6:1 của các chất đồng phân. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 2,80 (1H, dd), 2,94 (1H, dd), 3,05 (1H, dd), 3,25 (1H, dd), 3,33 (1H, ddd), 5,04 (1H, s), 6,95 (1H, d), 7,08 - 7,12 (2H, m), 7,28 - 7,33 (1H, m), 7,37 - 7,40 (2H, m), 8,08 (1H, d), 10,12 (1H, s); *m/z*: ES- [M-H]- 422.

Ví dụ 28

Điều chế 1-(3-flopropyl)-*N*-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin

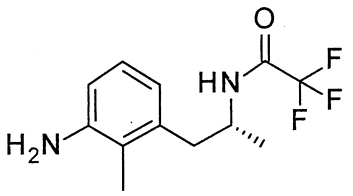


Bổ sung tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (10 mg, 0,01 mmol) và natri *tert*-butoxit (0,127 g, 1,32 mmol) trong một phần vào dung dịch đã khử khí của 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,033 g, 0,25 mmol) và (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (0,10 g, 0,22 mmol) trong 1,4-đioxan (1,10 ml). Sau đó nhúng hỗn hợp màu da cam trong bể dầu mà đã được gia nhiệt sơ bộ lên 50°C. Sau 5 phút, làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng. Trong bình thót cổ riêng rẽ, bổ sung natri *tert*-butoxit (1,81 g, 18,8 mmol) và tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (0,17 g, 0,19 mmol) trong một phần vào dung dịch đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (1,71 g, 3,76 mmol) và 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,597 g, 4,52 mmol) trong 1,4-đioxan (18,8 ml). Nhúng hỗn hợp màu da cam sáng trong bể dầu mà đã được gia nhiệt sơ bộ lên 50°C. Sau 5 phút, làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng. Ngay khi nguội, kết hợp cả hai phản ứng, pha loãng bằng etyl axetat và rửa tuần tự bằng

nước (x2) và natri clorua bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế dầu màu da cam thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến metanol 10% trong DCM, để thu được 1-(3-flopropyl)-N-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (1,84 g, 92%) dưới dạng chất rắn và hỗn hợp trans:cis ~84:16 dựa trên biên dạng UV HPLC. Phân giải nguyên liệu này bằng cách sử dụng SFC điều chế (cột: Chiralpak AD, 21,2 x 250 mm, 5 µm; 75 ml/phút), rửa giải bằng 20% (metanol chứa 0,2% NH_4OH) trong CO_2, để thu được 1-(3-flopropyl)-*N*-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (1,01 g) dưới dạng chất rắn màu da cam sáng và đỉnh rửa giải thứ hai. Tinh chế nguyên liệu này thêm bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% metanol trong etyl axetat, để thu được 1-(3-flopropyl)-*N*-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (0,954 g) dưới dạng chất rắn màu trắng. Tinh chế nguyên liệu này lần cuối bằng HPLC điều chế (cột: Xbridge C18, 30 x 100 mm, 5 µm, 40 ml/phút), rửa giải bằng từ 40 đến 70% axetonotril trong (nước chứa 0,2% NH_4OH). Kết hợp các phân đoạn sản phẩm, rửa bằng etyl axetat (x3), và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được 1-(3-flopropyl)-*N*-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin (551 mg, 27%) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu trắng nhờ. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,04 (3H, d), 1,63 (2H, dtt), 2,44 (2H, t), 2,70 (2H, dd), 2,81 (1H, dd), 2,84 - 2,94 (1H, m), 3,09 (1H, dd), 3,34 (1H, br s), 3,44 (1H, dqd), 3,61 (2H, dd), 3,77 (3H, s), 3,90 (1H, m), 4,43 (2H, dt), 5,28 (1H, s), 5,87 (1H, dd), 6,02 (1H, d), 6,16 (1H, d), 6,32 (1H, d), 6,65 (1H, d), 7,18 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,95 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 506.

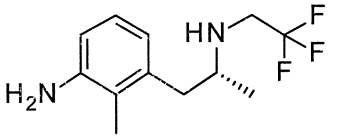
Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin được mô tả dưới đây.

Điều chế (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2,2-trifloaxetamit



Bổ sung etyl 2,2,2-trifloaxetat (3,75 ml, 31,5 mmol) vào dung dịch màu đỏ-hổ phách đậm của (*R*)-3-(2-aminopropyl)-2-metylanilin (5,17 g, 31,5 mmol) và trietylamin (4,83 ml, 34,6 mmol) trong MeOH (70,1 ml). Sau 15 phút, cô phản ứng để thu được dầu màu hổ phách đậm. Hòa tan dầu trong etyl axetat, rửa bằng nước, và chiết lớp nước bằng etyl axetat (x2). Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế dầu thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 40% etyl axetat trong hexan, để thu được (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2,2-trifloaxetamit (6,47 g, 79%) dưới dạng dầu màu vàng cam mà kết tinh thành chất rắn màu da cam sáng khi để yên. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,11 (3H, d), 2,01 (3H, s), 2,63 (1H, dd), 2,78 (1H, dd), 3,93 - 4,05 (1H, m), 4,71 (2H, s), 6,36 (1H, dd), 6,49 (1H, dd), 6,78 (1H, t), 9,25 (1H, br d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 261.

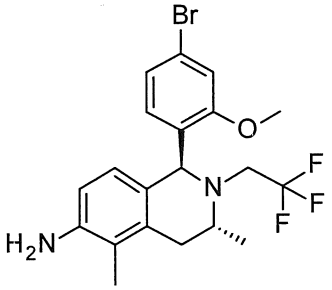
Điều chế (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin



Bổ sung phức hợp boran tetrahyđrofuran trong THF (1 M; 149 ml, 149 mmol) qua bơm tiêm (6 x 25 ml) vào dung dịch của (*R*)-*N*-(1-(3-amino-2-metylphenyl)propan-2-yl)-2,2,2-trifloaxetamit (6,47 g, 24,9 mmol) trong tetrahyđrofuran (81 ml) ở nhiệt độ 0°C. Loại bỏ bể nước đá, và, khi ấm lên, quan sát thấy sự thoát khí. Khi không nhìn thấy sự thoát khí nữa (~20 phút), để phản ứng ấm lên 65°C. Sau 4 giờ, làm nguội phản ứng và duy trì ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Sau đó làm nguội phản ứng xuống 0°C và dập tắt bằng cách bổ sung từng giọt metanol (22 ml). Để phản ứng ấm lên nhiệt độ trong phòng, và, sau khi sự thoát khí ngừng lại, để phản ứng ấm lên 65°C. Sau 14 giờ, làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và khuấy trong điều kiện này

trong 3,5 ngày trước khi cô dưới áp suất giảm. Tinh chế dầu thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 70% etyl axetat trong hexan, để thu được (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (5,62 g, 92%) dưới dạng dầu màu vàng sáng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,90 (3H, d), 1,98 (3H, s), 2,09 - 2,20 (1H, m), 2,25 - 2,40 (1H, m), 2,72 - 2,84 (2H, m), 3,17 - 3,29 (2H, m), 4,69 (2H, s), 6,36 (1H, dd), 6,49 (1H, dd), 6,78 (1H, t). *m/z*: ES+ [M+H]+ 247

Điều chế (1*S*,3*R*)-1-(4-Bromo-2-metoxyphenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin



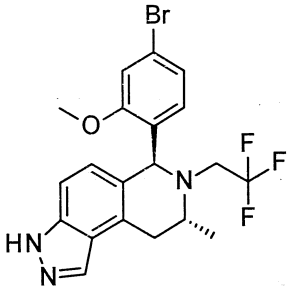
Bổ sung 4-bromo-2-metoxybenzalđehyt (1,83 g, 8,53 mmol) và (*R*)-2-metyl-3-(2-((2,2,2-trifloetyl)amino)propyl)anilin (2,00 g, 8,12 mmol) vào dung dịch của nước (0,7 ml, 41 mmol) và axit axetic (40 ml). Nhúng dung dịch màu vàng sáng thu được trong bể dầu mà đã được gia nhiệt sơ bộ lên 65°C và duy trì trong điều kiện này trong thời gian 18 giờ. Sau đó cô dung dịch màu hổ phách đậm thu được dưới áp suất giảm (bể nước: 55°C). Pha loãng phần cặn thu được bằng etyl axetat và rửa bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước đến khi xác nhận là lớp nước ở độ pH = 8 bằng cách sử dụng giấy kiểm tra độ pH. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Hòa tan phần cặn thu được trong metanol (20 ml) và bổ sung hyđroxylamin hyđroclorua (0,152 g, 2,19 mmol) và kali cacbonat dư. Sau 5 phút, pha loãng hỗn hợp bằng etyl axetat, lọc, và cô dịch lọc dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% etyl axetat trong hexan, để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin dưới dạng dầu màu hổ phách đậm ở tỉ lệ trans:cis 83:17 dựa trên sự kết hợp NMR. Cô lại dầu từ DCM và làm khô dưới chân không để thu được chất rắn dạng bọt màu hổ phách đậm (2,55 g, 71%). Phân giải lượng

nhỏ của nguyên liệu này (150 mg) bằng cách sử dụng SFC điều chế (cột: (*S*,*S*) Whelk-O1, 21,2 x 250 mm, 5 µm; 75 ml/phút), rửa giải bằng (metanol chứa 0,2% NH_4OH) 15% trong CO_2, để thu được (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin rửa giải chậm hơn (101 mg) và (1*R*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin rửa giải nhanh hơn (18 mg) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu vàng nhạt.

(1*S*,3*R*): ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (3H, d), 1,95 (3H, s), 2,43 (1H, dd), 2,64 - 2,85 (2H, m), 3,19 - 3,43 (2H, m), 3,86 (3H, s), 4,67 (2H, s), 5,18 (1H, s), 6,29 (1H, d), 6,41 (1H, d), 6,60 (1H, d), 6,96 (1H, dd), 7,18 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 443.

(1*R*,3*R*): ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,19 (3H, d), 1,94 (3H, s), 2,53 - 2,60 (1H, m), 2,78 (1H, br dd), 2,98 - 3,12 (1H, br m), 3,16 - 3,36 (2H, m), 3,84 (3H, s), 4,61 (2H, s), 5,31 (1H, s), 6,20 (1H, d), 6,33 (1H, d), 7,03 - 7,13 (2H, m), 7,19 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 443.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin

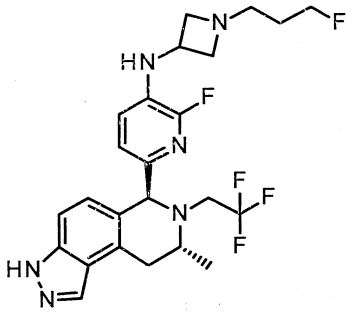


Bổ sung từng giọt dung dịch của natri nitrit (0,413 g, 5,98 mmol) trong nước (3,83 ml) trong 5 phút vào dung dịch có khuấy của (1*S*,3*R*)-1-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-3,5-đimetyl-2-(2,2,2-trifloetyl)-1,2,3,4-tetrahyđroisoquinolin-6-amin (2,55 g, 5,75 mmol; 83:17 trans:cis) trong axit propionic (19,2 ml) duy trì ở nhiệt độ -15°C bằng cách sử dụng bể làm mát chứa nước đá, natri clorua rắn, và natri clorua bão hòa trong nước. Sau 20 phút pha loãng phản ứng bằng toluen (100 ml) mà đã được làm lạnh từ trước xuống -70°C. Khuấy mạnh hỗn hợp màu vàng sáng thu được, và, sau 5 phút, loại bỏ bể làm mát. Khi đạt đến nhiệt độ trong

phòng, duy trì hỗn hợp phản ứng màu đỏ trong điều kiện này trong 1,5 giờ và sau đó rửa bằng nước (x2). Chiết các lớp nước kết hợp bằng etyl axetat. Làm khô các lớp hữu cơ kết hợp trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm xuống xấp xỉ 20% của thể tích bắt đầu. Pha loãng hỗn hợp này bằng EtOAc (20 ml) và rửa bằng natri bicacbonat bão hòa trong nước. Sau đó bổ sung kali cacbonat rắn đến khi sự thoát khí ngừng lại và hỗn hợp được thử nghiệm là bazơ bằng cách sử dụng giấy kiểm tra độ pH. Các lớp được tách riêng và làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế dầu thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 70% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(4-bromo-2-metoxyphenyl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (1,96 g, 75%) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu cam sáng và hỗn hợp trans:cis ~9:1 dựa trên sự kết hợp NMR. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,06 (3H, d), 2,80 - 2,98 (2H, m), 3,15 (1H, br dd), 3,33 - 3,53 (2H, m), 3,90 (3H, s), 5,40 (1H, s), 6,63 (1H, d), 6,67 (1H, d), 6,96 (1H, dd), 7,20 - 7,27 (2H, m), 8,08 (1H, s), 13,00 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 454.

Ví dụ 29

Điều chế 2-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin

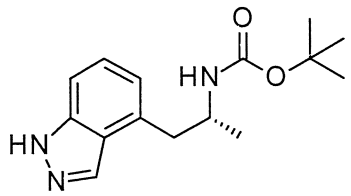


Bổ sung natri *tert*-butoxit (1,08 g, 11,3 mmol) và tiền chất xúc tác thế hệ thứ 3 BrettPhos (0,16 g, 0,18 mmol) vào dung dịch đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-6-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (2,00 g, 4,51 mmol) và 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (0,90 g, 5,41 mmol) trong 1,4-đioxan (22,6 ml) ở nhiệt độ trong phòng. Nhúng hỗn hợp màu đỏ-cam trong bể dầu đã gia nhiệt trước lên 44 °C. Sau 22 phút, lấy hỗn hợp màu da cam khỏi nguồn nhiệt và rót vào etyl axetat và natri clorua bão

hòa trong nước và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng etyl axetat, và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 30% metanol trong etyl axetat, để thu được 2-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (1,58 g) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu vàng sáng và hỗn hợp trans:cis xấp xỉ 84:16 dựa trên sự kết hợp NMR. Phân giải nguyên liệu này bằng SFC điều chế (cột: Lux Cellulose-4, 21,2 x 250 mm, 5 µm; 70 ml/phút), rửa giải bằng (metanol chứa 0,2% NH_4OH) 35% trong CO_2, để thu được chất rắn dạng bọt màu da cam sáng. Tái tinh chế chất rắn này bằng sắc ký silic oxit nhanh, gradien rửa giải từ 0 đến 30% metanol trong etyl axetat. Cô các phân đoạn sản phẩm dưới áp suất giảm. Hấp thu phần cặn thu được trong axetonitril, lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được 2-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (1,03 g, 46%) dưới dạng chất rắn dạng bọt màu vàng sáng. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,10 (3H, d), 1,64 (2H, dtt), 2,48 (2H, t), 2,83 (1H, dd), 2,86 (2H, br d), 2,97 (1H, br dq), 3,02 (1H, dd), 3,45 (1H, dqd), 3,54 (1H, dq), 3,63 (2H, br s), 3,96 (1H, dquin), 4,44 (2H, dt), 4,91 (1H, s), 6,13 (1H, br d), 6,87 (1H, d), 6,92 - 7,01 (2H, m), 7,25 (1H, d), 8,06 (1H, s), 13,00 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 495.

Các quy trình được sử dụng để điều chế nguyên liệu bắt đầu (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-6-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin được mô tả dưới đây.

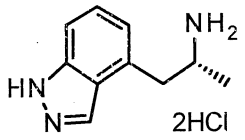
Điều chế *tert*-butyl (*R*)-(1-(1*H*-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat



Bổ sung *n*-butyllithi trong hexan (2,5 M; 96 ml, 241 mmol) vào dung dịch của 4-bromo-1*H*-inđazol (24,8 g, 126 mmol) trong THF (200 ml) ở nhiệt độ -78°C trong

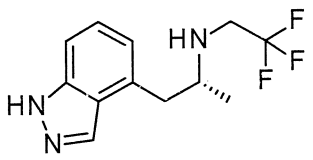
20 phút, và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 7 giờ. Bổ sung *tert*-butyl (*R*)-4-metyl-1,2,3-oxathiazoliđin-3-carboxylat 2,2-đioxit (26 g, 110 mmol), và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ - 78°C trong thời gian 15 phút. Loại bỏ bể làm mát, và khuấy hỗn hợp trong điều kiện này trong thời gian 18 giờ. Bổ sung axit xitric trong nước (1N; 130 ml) và tiếp tục khuấy trong thời gian 30 phút. Chiết hỗn hợp bằng hexan, và rửa lớp hữu cơ bằng natri cacbonat bão hòa trong nước, làm khô trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, rửa giải bằng từ 0 đến 60% EtOAc trong hexan, để tạo ra *tert*-butyl (*R*)-(1-(1*H*-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat (17,3 g, 57%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,02 (3H, br d), 1,34 (9H, s), 2,82 (1H, br dd), 3,09 (1H, br dd), 3,82 (1H, dt), 6,82 (1H, br d), 6,88 (1H, d), 7,24 (1H, dd), 7,35 (1H, br d), 8,18 (1H, s), 12,97 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 276.

Điều chế (*R*)-1-(1*H*-inđazol-4-yl)propan-2-amin đihyđroclorua



Bổ sung HCl đioxan (4 M, 100 ml, 400 mmol) vào huyền phù của *tert*-butyl (*R*)-(1-(1*H*-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat (17,3 g, 62,7 mmol) trong DCM (200 ml) ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Khuấy bột nhão thu được qua đêm và sau đó cô dưới áp suất giảm để thu được (*R*)-1-(1*H*-inđazol-4-yl)propan-2-amin (15,9 g, 102%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,14 (3H, d), 2,97 (1H, dd), 3,40 (1H, dd), 3,45 - 3,62 (1H, m), 6,96 (1H, d), 7,29 (1H, dd), 7,45 (1H, d), 7,97 - 8,27 (3H, br s), 8,29 (1H, d). *m/z*: ES+ [M+H]+ 176.

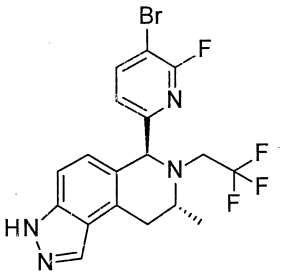
Điều chế (*R*)-1-(1*H*-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin



Bổ sung kali cacbonat (4,75 g, 34,3 mmol) vào huyền phù có khuấy của muối (*R*)-1-(1*H*-inđazol-4-yl)propan-2-amin đihyđroclorua (2,13 g, 8,58 mmol)

trong axetonitril (25 ml) sau đó bổ sung từng giọt 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (2,191 g, 9,44 mmol) trong DCM (12,6 ml). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1,5 ngày. Sau đó bổ sung thêm 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (398 mg) trong DCM (0,3 ml). Để phản ứng ấm lên 60°C và sau 3 giờ, làm nguội phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và bổ sung phần khác nữa của 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat (398 mg) dưới dạng dung dịch trong DCM (0,3 ml). Sau 18 giờ, cô phản ứng dưới áp suất giảm đến thể tích giảm đi và sau đó pha loãng bằng DCM. Rửa hỗn hợp bằng nước, và làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 60% etyl axetat trong hexan, để thu được (*R*)-1-(1*H*-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (2,06 g, 93%) dưới dạng gôm. *m/z*: ES+ [M+H]+ 257.

Điều chế (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-6-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

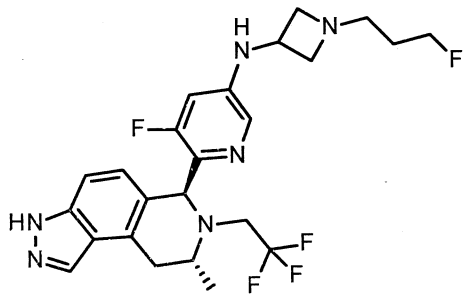


Bổ sung axit trifloaxetic (1,7 ml) vào dung dịch của (*R*)-1-(1*H*-inđazol-4-yl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (1,83 g, 7,11 mmol) và 5-bromo-6-flopicolinalđehyt (1,45 g, 7,11 mmol) trong toluen (33,8 ml). Gia nhiệt phản ứng ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 24 giờ và sau đó cô đến thể tích giảm đi. Sau đó pha loãng hỗn hợp bằng điclometan và bazơ hóa bằng natri hyđrocacbonat bão hòa trong nước. Làm khô lớp hữu cơ trên natri sulfat, lọc và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế phần cặn thu được bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 50% etyl axetat trong hexan, để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-6-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin (2,01 g, 64%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,11 (3H, d), 2,89 (1H, br dd), 2,94 - 3,09 (2H, m), 3,31 - 3,42 (1H, m), 3,52 - 3,71 (1H, m), 5,07 (1H, s), 6,96 (1H, d), 7,24 - 7,36 (2H, m), 8,06 (1H, d), 8,23 (1H,

dd), 13,02 (1H, s). *m/z*: ES+ [M+H]+ 443.

Ví dụ 30

5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin

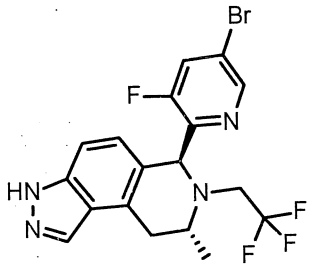


Tạo huyền phù 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (435 mg, 3,29 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (730 mg, 1,65 mmol) và natri *tert*-butoxit (950 mg, 9,88 mmol) trong 1,4-đioxan (18,3 ml). Khử khí hỗn hợp và bổ sung tiền chất xúc tác Brettphos 3G (149 mg, 0,16 mmol). Gia nhiệt phản ứng lên 80°C trong thời gian 1 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ trong phòng và pha loãng bằng etyl axetat (10 ml) và rửa bằng nước (10 ml). Làm khô lớp hữu cơ trên magie sulfat, lọc và cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng LCMS điều chế (cột Waters XSelect CSH C18, silic oxit 5µ, đường kính 50 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 1% NH_3) và MeCN làm các chất rửa giải. Hòa tan mẫu trong MeOH và phân tách bằng SFC bằng cách sử dụng các điều kiện sắc ký sau đây: Cột: Phenomonex Lux C1, 30 x 250 mm, 5 micromet, pha động: 30% MeOH + 0,1% NH_3 / 70% $scCO_2$ để thu được 5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin (396 mg, 49%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,15 (3H, d), 1,69 - 1,81 (2H, m), 2,60 (2H, t), 2,77 (1H, dd), 2,92 - 3,03 (3H, m), 3,14 - 3,31 (2H, m), 3,65 - 3,79 (3H, m), 4,04 (1H, q), 4,43 (2H, t), 4,53 (1H, t), 5,35 (1H, s), 6,54 (1H, dd), 6,76 (1H, d), 7,00 (1H, d), 7,66 (1H, d), 7,93 (1H, d), 11,06 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 495.

Tổng hợp (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-

6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin dùng làm nguyên liệu bắt đầu như sau:

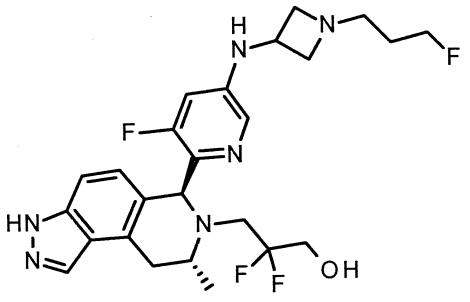
(6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung axit trifloaxetic (2,13 ml) vào dung dịch của (*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (1,15 g, 4,47 mmol) và 5-bromo-3-flopicolinalđehyt (912 mg, 4,47 mmol) trong toluen (42,6 ml) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 30 phút. Làm bay hơi phản ứng và phần cặn phân chia giữa DCM (20 ml) và NaOH 2M (20 ml). Các lớp được tách riêng và cô pha hữu cơ dưới áp suất giảm. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 40% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (1,15 g, 58%) dưới dạng chất rắn màu vàng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,16 (3H, d), 2,86 (1H, dd), 3,01 (1H, dq), 3,19 - 3,35 (2H, m), 3,68 - 3,78 (1H, m), 5,42 (1H, s), 6,80 (1H, d), 7,20 (1H, d), 7,59 (1H, dd), 8,05 (1H, d), 8,27 - 8,5 (1H, m). *m/z*: ES+ [M+H]+ 443.

Ví dụ 31

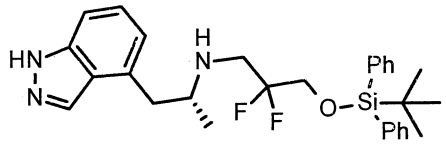
2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol



Bổ sung tetrabutylamoni florua (1,0 M trong THF, 0,65 ml, 0,65 mmol) vào dung dịch của 6-((6*S*,8*R*)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (320 mg, 0,43 mmol) trong THF (2,66 ml) ở nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 64 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng và sau đó hòa tan trong DMSO và tinh chế sản phẩm thô bằng pha đảo nhanh (Puriflash, 220 g, C18, 30 µ cột), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa 1% NH_3) và MeCN làm các chất rửa giải. Làm bay hơi các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn đến khô để thu được sản phẩm thô (143 mg). Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 20% MeOH trong EtOAc. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol (118 mg, 54%) dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân. Tái tinh chế nguyên liệu bằng HPLC điều chế (cột Waters XSelect CSH C18, silic oxit 5µ, đường kính 30 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa axit formic 0,1%) và MeCN làm các chất rửa giải. Kết hợp các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn và tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion, bằng cách sử dụng cột SCX-2. Rửa giải sản phẩm mong muốn từ cột bằng cách sử dụng NH_3/MeOH 1M và làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được 2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol (62,1 mg, 29%) dưới dạng chất rắn không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,03 (3H, dd), 1,64 (2H, dq), 2,44 (2H, t), 2,60 - 2,66 (1H, m), 2,79 (3H, dd), 2,97 (1H, dd), 3,04 - 3,15 (1H, m), 3,50 - 3,73 (5H, m), 3,89 - 3,97 (1H, m), 4,39 (1H, t), 4,48 (1H, t), 5,21 (1H, s), 5,26 (1H, t), 6,58 (1H, d), 6,65 - 6,71 (2H, m), 7,19 (1H, d), 7,55 (1H, dd), 8,03 (1H, s), 12,94 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 507.

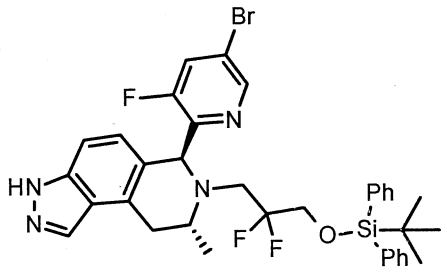
Tổng hợp 6-((6*S*,8*R*)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin dùng làm nguyên liệu bắt đầu như sau:

(*R*)-*N*-(1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)-3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropan-1-amin



Bổ sung 3-((*Tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl triflometansulfonat (2,59 g, 5,36 mmol) vào dung dịch của (*R*)-1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin (0,94 g, 5,36 mmol) và DIPEA (1,39 ml, 8,05 mmol) trong 1,4-đioxan (38,9 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 18 giờ. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng sau đó pha loãng phần cặn bằng EtOAc và rửa bằng nước và chiết lớp nước thêm bằng EtOAc. Rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước muối bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi đến khô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 50% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (*R*)-N-(1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)-3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropan-1-amin (1,515 g, 52%) dưới dạng gôm không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,92 (3H, d), 0,97 (9H, s), 1,78 - 1,86 (1H, m), 2,73 (1H, dd), 2,98 - 3,14 (4H, m), 3,83 (2H, td), 6,85 (1H, d), 7,20 (1H, dd), 7,34 (1H, d), 7,41 - 7,50 (6H, m), 7,58 - 7,64 (4H, m), 8,08 (1H, s), 12,98 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 508.

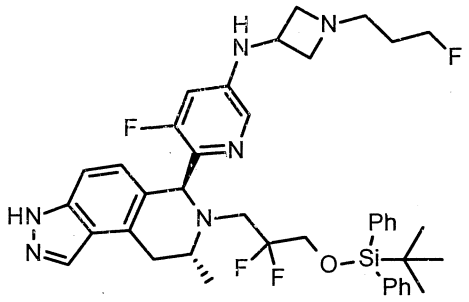
(6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-đifloropropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung axit trifloaxetic (319 µl) vào dung dịch của (*R*)-N-(1-(1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)-3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropan-1-amin (681 mg, 1,34 mmol) và 5-bromo-3-flopicolinalđehyt (287 mg, 1,41 mmol) trong toluen (6,39 ml) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 1

giờ. Để cho phản ứng nguội xuống nhiệt độ trong phòng, làm bay hơi đến khô và hòa tan trong DMSO. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký pha đảo nhanh (cột Redisep Rf C18 100g), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa axit formic 0,1%) và MeCN (60 - 100%) làm các chất rửa giải. Kết hợp các phân đoạn chứa hợp chất mong muốn và phân lập bằng sắc ký trao đổi ion, bằng cách sử dụng cột SCX-2. Rửa giải sản phẩm mong muốn từ cột bằng cách sử dụng NH_3/MeOH 1M và làm bay hơi các phân đoạn tinh khiết đến khô để thu được (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (763 mg, 82%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhờ. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 0,99 (9H, s), 1,04 (3H, d), 2,74 - 2,89 (2H, m), 2,97 - 3,04 (1H, m), 3,31 (1H, s), 3,54 - 3,62 (1H, m), 3,78 (1H, q), 3,92 - 4,02 (1H, m), 5,36 (1H, s), 6,72 (1H, d), 7,23 (1H, d), 7,41 - 7,49 (6H, m), 7,57 - 7,61 (4H, m), 8,04 (1H, dd), 8,09 (1H, s), 8,38 (1H, d), 13,01 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 693.

6-((6*S*,8*R*)-7-(3-((*tert*-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin

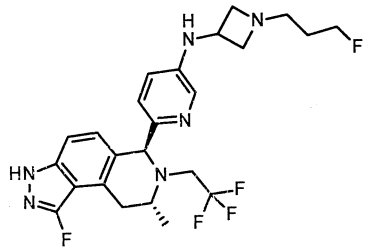


Tạo huyền phù 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (114 mg, 0,86 mmol), (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-7-(3-((tert-butylđiphenylsilyl)oxy)-2,2-điflopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (300 mg, 0,43 mmol) và natri *tert*-butoxit (249 mg, 2,59 mmol) trong 1,4-đioxan đã khử khí (4,81 ml). Bổ sung tiền chất xúc tác Brettphos 3G (39,2 mg, 0,04 mmol) và làm bay hơi hỗn hợp và sục bằng nitơ (x2) và sau đó gia nhiệt phản ứng lên 80°C trong thời gian 45 phút. Để cho hỗn hợp phản ứng nguội xuống nhiệt độ trong phòng và pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng nước. Chiết lớp nước thêm bằng

EtOAc và rửa các lớp hữu cơ kết hợp bằng nước muối bão hòa, làm khô trên magie sulfat, lọc và làm bay hơi đến khô và sử dụng trực tiếp mà không tinh chế thêm. *m/z*: ES+ [M+H]+ 745.

Ví dụ 32

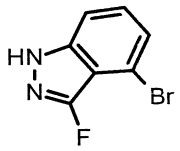
6-((6*S*, 8*R*)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,9,8-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquin-6-yl)-*N*-(3-flopropyl)azetiđi-3-yl)pyriđin-3-amin



Bổ sung natri *tert*-butoxit (116 mg, 1,20 mmol) và BrettPhos G3 (9,09 mg, 10,04 µmol) vào dung dịch đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (89 mg, 0,20 mmol) và 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (39,8 mg, 0,30 mmol) trong 1,4-đioxan (1,00 ml) và để phản ứng ấm lên 90°C và khuấy trong thời gian 6 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng EtOAc và nước, và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng EtOAc, sau đó làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên natri sulfat và làm bay hơi. Tinh chế bằng HPLC (cột Waters CSH C18 OBD, 5 µ silic oxit, đường kính 30 mm, chiều dài 100 mm), bằng cách sử dụng hỗn hợp phân cực giảm của nước (chứa NH_3 0,1% và MeCN làm các chất rửa giải) để tạo ra sản phẩm (42,0 mg, 42%) dưới dạng màng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,13 (3H, d), 1,69 - 1,84 (2H, m), 2,61 (2H, td), 2,76 (1H, dd), 2,94 (3H, ddd), 3,16 - 3,28 (2H, m), 3,45 - 3,54 (1H, m), 3,67 - 3,76 (2H, m), 4,09 (1H, dt), 4,24 (1H, d), 4,43 (1H, td), 4,53 (1H, td), 5,02 (1H, s), 6,76 (1H, dd), 6,81 (1H, d), 6,89 (1H, dd), 7,39 (1H, d), 7,81 (1H, d), 11,10 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 495.

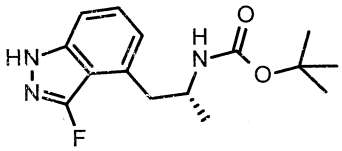
Tổng hợp (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin dùng làm nguyên liệu bắt đầu như sau:

4-Bromo-3-flo-1H-inđazol



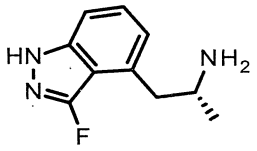
Bổ sung Selectfluor (49,40 g, 139,6 mmol) vào dung dịch của 4-bromo-1H-inđazol (25,0 g, 127 mmol) trong DMF (254 ml) và gia nhiệt phản ứng lên 70°C qua đêm. Sau khi để nguội, rót hỗn hợp phản ứng lên nước. Lọc chất rắn kết tủa và làm khô, sau đó tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải từ 0 đến 30% EtOAc trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được 4-bromo-3-flo-1H-inđazol (4,20 g, 15%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 7,24 - 7,28 (1H, m), 7,32 - 7,36 (2H, m), 9,20 (1H, s); *m/z*: ES- [M-H]- 213.

Tert-butyl (*R*)-(1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat



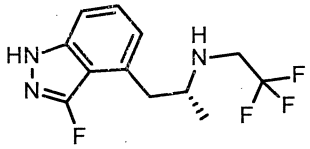
Bổ sung n-butyl lithi (1,6M, 51,9 ml, 83,01 mmol) vào 4-bromo-3-flo-1H-inđazol (8,50 g, 39,5 mmol) trong THF (124 ml) ở nhiệt độ -78°C và khuấy phản ứng trong thời gian 15 phút, để ấm lên -50 °C trong thời gian 15 phút, sau đó làm nguội trở lại -78°C. Bổ sung *tert*-butyl (*R*)-4-metyl-1,2,3-oxathiazoliđin-3-carboxylat 2,2-đioxit (10,32 g, 43,48 mmol) trong THF (20 ml) và khuấy phản ứng trong thời gian 15 phút trước khi để cho ấm lên đến -10°C trong 30 phút. Bổ sung axit xitric 1N (200 ml) và khuấy hỗn hợp trong thời gian 15 phút, trước khi chiết bằng EtOAc (x2). Làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên magie sulfat và làm bay hơi. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký silic oxit nhanh, građien rửa giải EtOAc từ 0 đến 40% trong heptan. Làm bay hơi các phân đoạn chứa sản phẩm đến khô để thu được *tert*-butyl (*R*)-(1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat (5,93 g, 51%) dưới dạng chất rắn không màu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 2 7°C) 1,17 (3H, d), 1,35 (9H, s), 3,09 (2H, d), 4,00 - 4,09 (1H, m), 4,41 - 4,49 (1H, m), 6,97 (1H, d), 7,22 (1H, dd), 7,33 (1H, dd), 9,36 (1H, s); *m/z*: ES- [M-H]- 292.

(*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin



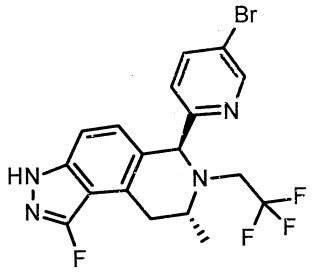
Bổ sung axit clohyđric 4N trong đioxan (23,86 ml, 95,45 mmol) vào *tert*-butyl (*R*)-(1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat (5,60 g, 19,1 mmol) trong MeOH (23,9 ml) và khuấy phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Cô hỗn hợp thô, sau đó tạo huyền phù trong EtOAc (100 ml) và rửa bằng natri bicacbonat bão hòa trong nước (50 ml). Chiết lớp nước bằng EtOAc (x5), sau đó làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên natri sulfat và làm bay hơi để thu được (*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin (3,10 g, 84%) dưới dạng dầu màu vàng, mà hóa rắn khi để yên. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,19 (3H, d), 2,86 (1H, dd), 3,09 (1H, dd), 3,33 (1H, dddd), 6,96 (1H, d), 7,22 (1H, dd), 7,33 (1H, dd), 9,93 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 194.

(*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin



Bổ sung dung dịch 2,2,2-trifloetyl triflometansulfonat 0,1M trong DCM (25,9 ml, 2,59 mmol) vào (*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)propan-2-amin (0,4 g, 2,07 mmol) và DIPEA (0,541 ml, 3,11 mmol) trong 1,4-đioxan (20 ml) và khuấy hỗn hợp thu được at 75°C qua đêm. Cô phản ứng trong chân không và nó phân chia giữa etyl axetat (25 ml) và natri bicacbonat bão hòa trong nước (25 ml). Các lớp được tách riêng và chiết lớp nước bằng etyl axetat (25 ml). Rửa các chất hữu cơ kết hợp bằng natri clorua bão hòa trong nước (25 ml), làm khô trên natri sulphate, lọc và cô trong chân không. Hấp thu gôm thu được trong metanol và cho vào hộp chứa SCX-2 đã được làm ẩm trước (metanol). Rửa hộp chứa bằng metanol và rửa giải bằng amoniac1M trong metanol. Cô chất rửa giải trong chân không để tạo ra (*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)-*N*-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (0,455 g, 80%) dưới dạng gôm màu nâu. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,11 (3H, d), 2,92 (1H, dd), 3,07 - 3,22 (4H, m), 6,96 (1H, d), 7,25 (1H, dd), 7,34 (1H, dd), 9,50 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 276.

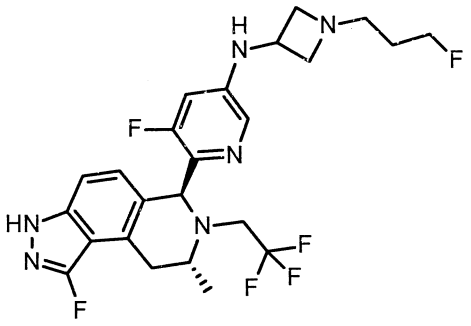
(6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin



Bổ sung axit trifluroaxetic (87 µl) vào dung dịch của (*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (100 mg, 0,36 mmol) và 5-bromopicolinalđehyt (67,6 mg, 0,36 mmol) trong toluen (0,87 ml) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 1 giờ. Để cho phản ứng nguội xuống nhiệt độ trong phòng và nó phân chia giữa DCM (5 ml) và natri bicacbonat bão hòa trong nước (5 ml). Các lớp được tách riêng và cô lớp hữu cơ trong chân không. Tinh chế bằng sắc ký cột silicagel rửa giải bằng 0-50% etyl axetat trong heptan để tạo ra (6*S*,8*R*)-6-(5-bromopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (89 mg, 55%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,16 (3H, d), 2,92 – 3,00 (2H, m), 3,25 - 3,36 (2H, m), 3,46 - 3,52 (1H, m), 5,07 (1H, s), 6,98 (1H, d), 7,09 (1H, dd), 7,43 (1H, d), 7,77 (1H, dd), 8,55 (1H, dd), 9,09 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 443.

Ví dụ 33

5-flo-6-((6*S*,8*R*)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin

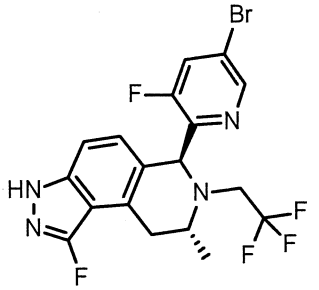


Bổ sung natri *tert*-butoxit (3,12 g, 32,52 mmol) và BrettPhos G3 (0,245 g, 0,27 mmol) vào dung dịch đã khử khí của (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-

1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (2,50 g, 5,42 mmol) và 1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin (1,075 g, 8,13 mmol) trong 1,4-đioxan (27,1 ml) và để phản ứng ấm lên 60°C và khuấy trong thời gian 2 giờ. Sau khi để nguội, pha loãng phản ứng bằng EtOAc và nước, và các lớp được tách riêng. Chiết lớp nước bằng EtOAc, sau đó làm khô các chất hữu cơ kết hợp trên natri sulfat và làm bay hơi. Tinh chế trước hết bằng sắc ký cột silicagel rửa giải bằng 0-100% (metanol 10% trong etyl axetat) trong heptan sau đó bằng Interchim pha đảo (0,1% NH_3 và MeCN làm các chất rửa giải) để tạo ra sản phẩm dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân. Các sản phẩm được tách riêng bằng SFC; hòa tan mẫu trong MeOH và phân tách bằng cách sử dụng các điều kiện SFC sau đây: Cột: Phenomonex C4, 30 x 250 mm, 5 micromet, pha động: 25% MeOH + 0,1% NH_3, tốc độ dòng chảy: 100 ml/phút, BPR 120 bar, nhiệt độ cột: 40 °C để tạo ra 5-flo-6-((6*S*,8*R*)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin (1,780 g, 64%) dưới dạng bọt. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,15 (3H, d), 1,67 - 1,81 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,81 - 3,03 (4H, m), 3,17 - 3,34 (2H, m), 3,70 (3H, q), 4,01 - 4,08 (1H, m), 4,20 (1H, d), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,32 (1H, s), 6,54 (1H, dd), 6,81 (1H, d), 6,95 (1H, d), 7,64 - 7,68 (1H, m), 9,46 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 513.

Tổng hợp (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin dùng làm nguyên liệu bắt đầu như sau:

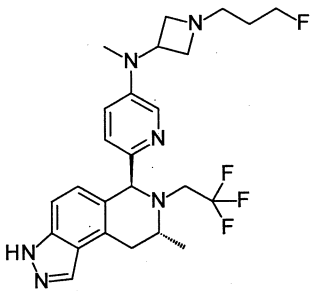
(6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin

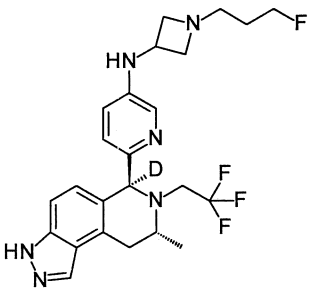
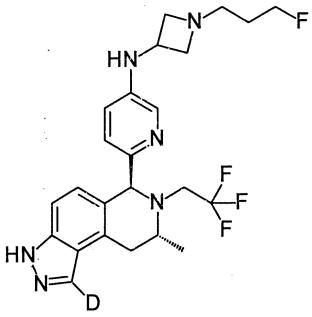
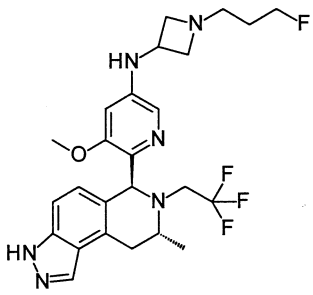


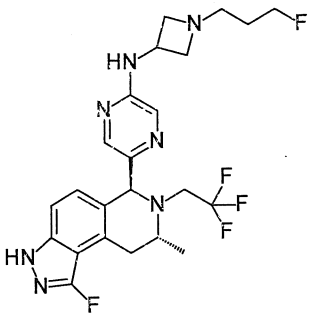
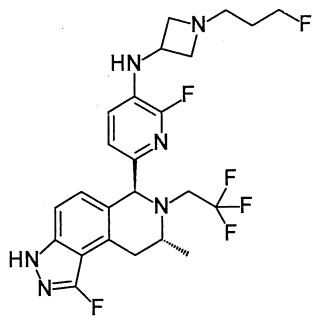
Bổ sung axit trifloaxetic (2,16 ml) vào dung dịch của (*R*)-1-(3-flo-1H-inđazol-4-yl)-N-(2,2,2-trifloetyl)propan-2-amin (2,50 g, 9,08 mmol) và 5-bromo-

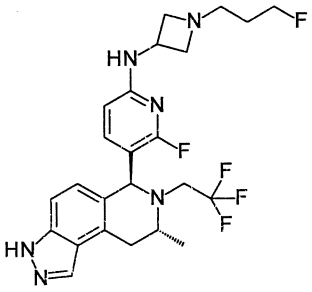
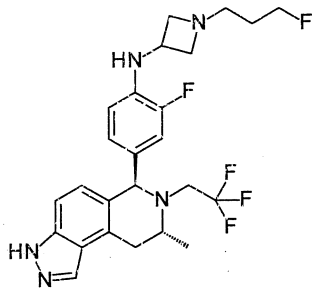
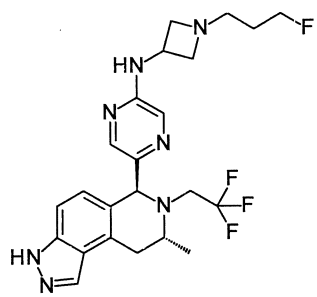
3-flopicolinalđehyt (1,85 g, 9,08 mmol) trong toluen (43,3 ml) và khuấy hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 90 phút. Để phản ứng nguội và phân chia giữa DCM (50 ml) và natri bicacbonat bão hòa trong nước (50 ml). Các lớp được tách riêng và cô lớp hữu cơ trong chân không. Tinh chế bằng sắc ký cột silicagel rửa giải bằng 0-50% etyl axetat trong heptan để tạo ra (6*S*,8*R*)-6-(5-bromo-3-flopyriđin-2-yl)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin (2,90 g, 69%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,15 (3H, d), 2,88 - 3,04 (2H, m), 3,24 - 3,35 (2H, m), 3,63 - 3,71 (1H, m), 5,39 (1H, s), 6,83 (1H, d), 7,08 (1H, dd), 7,60 (1H, dd), 8,36 (1H, dd), 9,13 (1H, s); *m/z*: ES+ [M+H]+ 461.

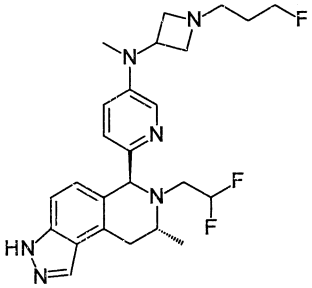
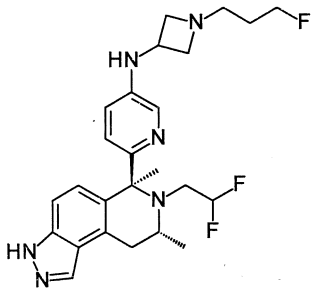
Các ví dụ từ 34 đến 73 (bảng dưới đây) được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp tương tự với phương pháp được mô tả ở trên.

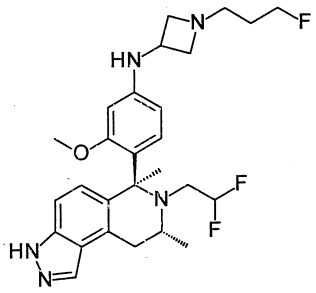
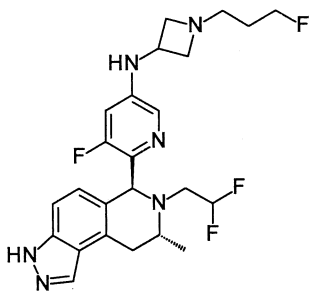
Ví dụ số	Cấu trúc	Tên	1H NMR	LCMS [M+H]
34		*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-N-metyl-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,15 (3H, d), 1,65 - 1,86 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,74 - 2,84 (1H, m), 2,85 (3H, s), 2,89 - 3,09 (3H, m), 3,16 - 3,41 (2H, m), 3,59 (1H, td), 3,64 - 3,80 (2H, m), 4,10 (1H, q), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,06 (1H, s), 6,89 (1H, d), 6,99 (1H, dd), 7,11 (1H, d), 7,30 (1H, d), 7,96 - 7,98 (2H, m), 10,78 (1H, s).	491

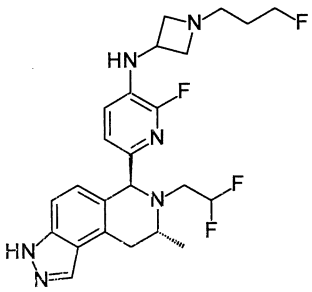
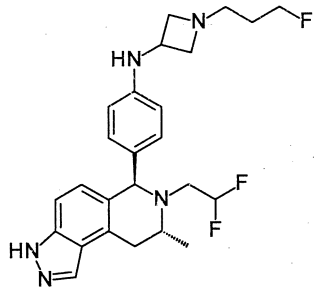
35		*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-6-đoteri-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,76 (2H, dq), 2,62 (2H, t), 2,85 (1H, dd), 2,93 - 2,98 (2H, m), 2,99 - 3,04 (1H, m), 3,21 - 3,31 (2H, m), 3,55 - 3,63 (1H, m), 3,73 (2H, s), 4,11 (2H, s), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 6,80 (1H, dd), 6,90 (1H, d), 7,16 (1H, d), 7,21 (1H, d), 7,84 (1H, d), 8,01 (1H, s)	478
36		*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-1-đoteri-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,71 - 1,81 (2H, m), 2,62 (2H, t), 2,86 (1H, dd), 2,93 - 3,04 (3H, m), 3,20 - 3,32 (2H, m), 3,59 (1H, d), 3,73 (2H, s), 4,11 (2H, s), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,03 (1H, s), 6,80 (1H, d), 6,90 (1H, d), 7,18 (2H, dd), 7,84 (1H, s)	478
37		*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-5-metoxy-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,08 (3H, d), 1,52 - 1,78 (2H, m), 2,46 (2H, t), 2,63 - 2,84 (3H, m), 2,87 - 3,07 (2H, m), 3,34 - 3,50 (1H, m), 3,58 - 3,69 (2H, m), 3,80 (3H, s), 3,83 - 4,07 (2H, m), 4,45	507

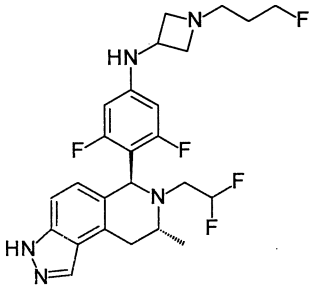
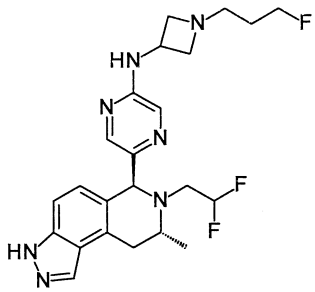
		f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin	(2H, dt), 5,42 (1H, s), 6,24 (1H, d), 6,54 (1H, d), 6,66 (1H, d), 7,17 (1H, d), 7,26 (1H, d), 8,03 (1H, s), 12,90 (1H, s).	
38		5-((6*S*,8*R*)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyrazin-2-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,16 (3H, d), 1,68 - 1,85 (2H, m), 2,63 (2H, t), 2,83 (1H, dd), 2,93 – 2,98 (1H, m), 2,99 - 3,07 (2H, m), 3,21 (1H, dd), 3,24 - 3,35 (1H, m), 3,49 - 3,54 (1H, m), 3,72 (2H, t), 4,44 (1H, t), 4,47 (1H, d), 4,53 (1H, t), 5,05 (1H, s), 5,37 (1H, d), 6,89 (1H, d), 6,96 (1H, dd), 7,75 (1H, d), 8,17 (1H, d), 10,63 (1H, s).	496
39		2-flo-6-((6*S*,8*R*)-1-flo-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,69 - 1,86 (2H, m), 2,63 (2H, t), 2,83 (1H, dd), 2,91 - 3,08 (3H, m), 3,13 - 3,38 (2H, m), 3,52 (1H, ddd), 3,77 (2H, q), 4,11 (1H, q), 4,31 - 4,39 (1H, m), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,95 (1H, s), 6,85 (1H, dd), 6,89 - 6,98 (2H, m), 7,23 (1H, d), 10,41 (1H, s)	513

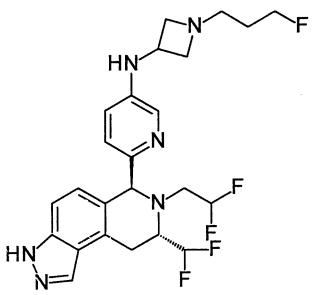
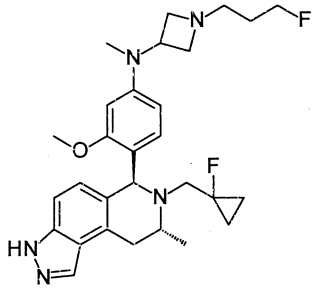
40		6-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-5-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-2-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,83 (2H, dp), 2,76 (2H, s), 2,81 - 2,91 (1H, m), 2,90 - 3,03 (1H, m), 3,11 - 3,32 (4H, m), 3,53 (1H, dt), 3,84 (2H, d), 4,46 (2H, q), 4,55 (1H, t), 5,20 (1H, s), 5,98 - 6,10 (1H, m), 6,83 (1H, d), 6,99 - 7,08 (1H, m), 7,23 (1H, d), 8,06 (1H, d), 10,48 (1H, s).	495
41		*N*-(2-flo-4-((6*R*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,69 - 1,83 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,77 (1H, dd), 2,84 - 2,89 (2H, m), 2,89 - 2,98 (1H, m), 3,03 (1H, dd), 3,21 (1H, dq), 3,38 (1H, ddd), 3,71 - 3,80 (2H, m), 4,04 - 4,16 (2H, m), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,97 (1H, s), 6,41 (1H, t), 6,76 (1H, dd), 6,90 (1H, dd), 6,97 (1H, d), 7,28 (1H, d), 8,06 (1H, d), 10,20 (1H, s).	494
42		*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-5-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,11 (3H, d), 1,49 - 1,80 (2H, m), 2,42 - 2,48 (2H, m), 2,76 - 2,93 (3H, m), 2,93 - 3,21 (2H, m),	478

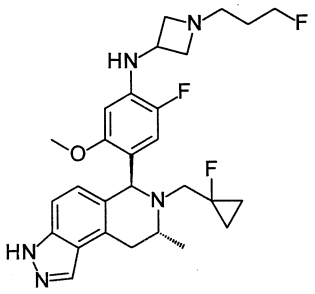
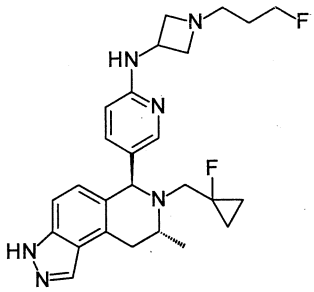
		tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyrazin-2-amin	3,42 - 3,69 (4H, m), 4,23 - 4,34 (1H, m), 4,45 (2H, dt), 4,99 (1H, s), 6,85 (1H, d), 7,25 (1H, d), 7,42 (1H, d), 7,78 (1H, d), 7,82 (1H, d), 8,06 (1H, s), 12,98 (1H, s).	
43		6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-N-metylpyriđin-3-amin	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,06 (3H, d), 1,56 - 1,78 (2H, m), 2,42 - 2,48 (2H, m), 2,55 - 2,70 (1H, m), 2,81 (3H, s), 2,82 - 2,95 (3H, m), 2,96 - 3,23 (2H, m), 3,39 - 3,54 (1H, m), 3,57 - 3,69 (2H, m), 4,05 (1H, quin), 4,45 (2H, dt), 4,93 (1H, s), 5,88 (1H, tt), 6,77 (1H, d), 7,07 (2H, d), 7,21 (1H, d), 7,93 (1H, t), 8,05 (1H, s), 12,95 (1H, s).	473
44		6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6,8-đimetyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,20 (3H, d), 1,68 - 1,81 (3H, m), 1,87 (3H, s), 2,59 (2H, t), 2,89 (2H, d), 3,01 (2H, dd), 3,32 (1H, dd), 3,54 - 3,62 (1H, m), 3,68 - 3,75 (2H, m), 3,93 (1H, d), 4,07 (1H, q), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,25 - 5,62 (1H, m), 6,68 (1H,	473

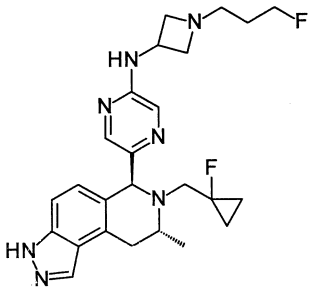
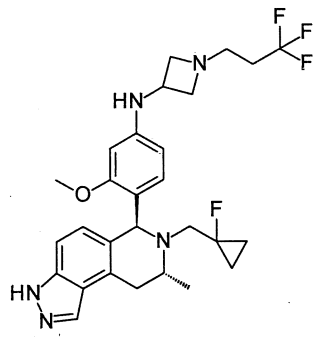
			dd), 7,01 (1H, d), 7,08 (1H, d), 7,20 (1H, d), 7,83 (1H, d), 8,06 (1H, s), 10,01 (1H, s).	
45		*N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-6,8-dimetyl-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxypheny l)-1-(3-flopropyl)azetidin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,68 - 1,82 (2H, m), 1,85 (3H, s), 2,58 (2H, t), 2,78 - 2,99 (5H, m), 3,17 (1H, dd), 3,44 (3H, s), 3,49 - 3,60 (1H, m), 3,66 - 3,78 (2H, m), 3,89 (1H, d), 4,03 - 4,14 (1H, m), 4,48 (2H, dt), 5,26 - 5,54 (1H, m), 5,97 (1H, dd), 6,03 (1H, d), 6,82 (1H, d), 7,00 (1H, d), 7,17 (1H, d), 8,06 (1H, d), 9,95 (1H, s).	502
46		6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetidin-3-yl)pyridin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,14 (3H, d), 1,66 - 1,82 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,72 - 2,80 (1H, m), 2,85 (1H, dd), 2,90 (2H, d), 2,98 - 3,12 (1H, m), 3,24 (1H, dd), 3,49 (1H, d), 3,64 - 3,73 (2H, m), 3,98 - 4,08 (1H, m), 4,16 (1H, d), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,28 (1H, s), 5,58 - 5,89 (1H, m), 6,52 (1H, dd), 6,82 (1H, d), 7,19 (1H, d), 7,64 - 7,69 (1H, m), 8,05 (1H, s), 10,04 (1H,	477

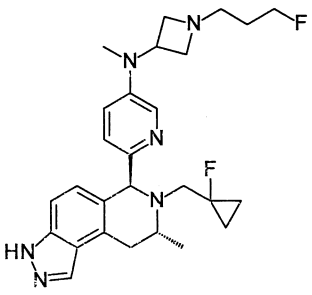
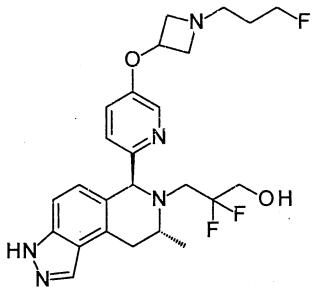
			s).	
47		6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-2-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,12 (3H, d), 1,67 - 1,81 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,79 (1H, dddd), 2,86 - 2,93 (2H, m), 3,04 (1H, ddd), 3,33 (1H, dd), 3,53 - 3,62 (1H, m), 3,69 - 3,79 (2H, m), 4,06 (1H, q), 4,21 (1H, d), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,89 (1H, s), 5,48 - 5,76 (1H, m), 6,75 (1H, dd), 6,93 (1H, d), 6,98 (1H, d), 7,19 (1H, d), 8,05 (1H, s), 9,99 (1H, s).	477
48		*N*-(4-((6*R*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,96 (3H, d), 1,52 - 1,64 (2H, m), 2,49 - 2,61 (1H, m), 2,63 - 2,78 (3H, m), 2,88 - 3,02 (2H, m), 3,26 - 3,31 (1H, m), 3,53 - 3,64 (2H, m), 3,80 - 3,87 (1H, m), 4,38 (2H, dt), 4,74 (1H, s), 5,76 (1H, tt), 5,88 - 5,93 (1H, m), 6,33 (2H, d), 6,70 (1H, d), 6,80 (2H, d), 7,17 (1H, d), 7,98 (1H, s), 12,91 (1H, s). (Hai hyđro không được quan sát thấy).	458

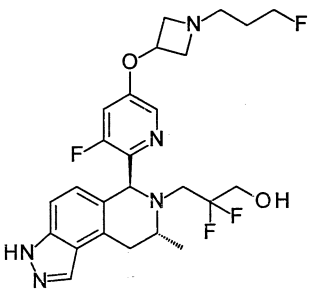
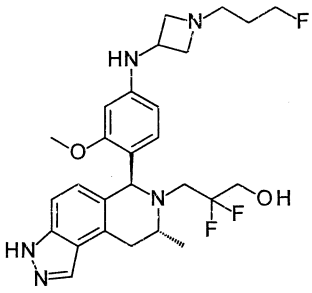
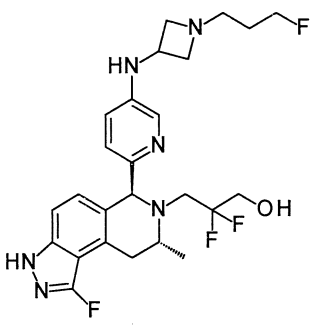
49		*N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3,5-điflophenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,95 (3H, d), 1,58 - 1,70 (2H, m), 2,50 - 2,70 (3H, m), 2,79 (1H, br dd), 2,86 - 2,97 (1H, m), 2,95 - 3,12 (2H, m), 3,09 (1H, br dd), 3,33 - 3,45 (1H, m), 3,71 - 3,88 (2H, m), 3,88 - 4,01 (1H, m), 4,38 (2H, dt), 5,03 (1H, s), 5,70 (1H, tt), 6,03 (2H, br d), 6,63 (1H, d), 6,69 (1H, br d), 7,13 (1H, d), 7,96 (1H, s), 12,89 (1H, s)	494
50		5-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyrazin-2-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,06 (3H, d), 1,56 - 1,70 (2H, m), 2,42 - 2,47 (2H, m), 2,57 - 2,69 (1H, m), 2,75 - 2,87 (3H, m), 2,99 - 3,13 (2H, m), 3,43 - 3,51 (1H, m), 3,54 - 3,62 (2H, m), 4,29 (1H, sxt), 4,43 (2H, dt), 4,94 (1H, s), 5,97 (1H, tt), 6,79 (1H, d), 7,22 (1H, d), 7,41 (1H, d), 7,77 (1H, d), 7,84 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,97 (1H, s)	460

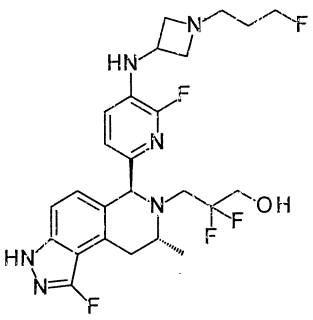
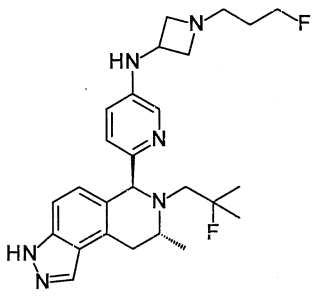
51		6-((6*S*,8*S*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-(điflometyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,68 - 1,86 (2H, m), 2,63 (2H, dd), 2,98 (2H, dd), 3,00 - 3,07 (1H, m), 3,20 (1H, dd), 3,28 - 3,44 (2H, m), 3,70 (3H, q), 4,10 (1H, dh), 4,43 (2H, t), 4,52 (1H, t), 5,19 (1H, s), 5,43 (1H, tdd), 5,81 (1H, td), 6,77 (1H, dd), 6,84 (1H, d), 7,09 (2H, t), 7,86 (1H, d), 8,00 - 8,02 (1H, m).	495
52		*N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)-N-metylazetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,46 - 0,62 (2H, m), 0,85 - 1,03 (2H, m), 1,10 (3H, d), 1,66 - 1,89 (2H, m), 2,56 - 2,62 (2H, m), 2,64 (1H, d), 2,80 (3H, s), 2,89 (1H, dd), 2,98 (2H, dt), 3,09 (1H, dd), 3,33 (1H, dd), 3,73 (2H, q), 3,80 (1H, q), 3,87 (3H, s), 4,08 (1H, p), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,37 (1H, s), 6,13 (1H, dd), 6,26 (1H, d), 6,79 (2H, t), 7,07 (1H, d), 8,05 (1H, s), 10,53 (1H, s).	510

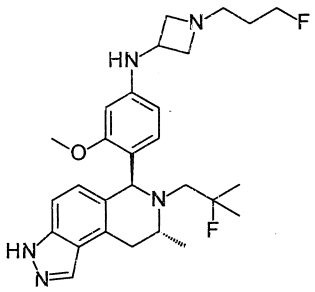
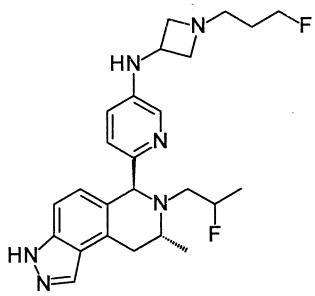
53		*N*-(2-flo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-5-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,46 - 0,52 (2H, m), 0,92 - 1,01 (2H, m), 1,08 (3H, d), 1,71 - 1,83 (2H, m), 2,55 - 2,64 (3H, m), 2,84 - 2,93 (3H, m), 3,02 - 3,11 (1H, m), 3,35 - 3,42 (1H, m), 3,77 - 3,89 (6H, m), 4,03 - 4,09 (1H, m), 4,12 - 4,18 (1H, m), 4,50 (2H, dt), 5,30 (1H, s), 6,13 (1H, d), 6,65 (1H, d), 6,80 (1H, d), 7,12 (1H, d), 8,05 (1H, s), 9,97 (1H, s).	514
54		5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-2-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,47 - 0,61 (2H, m), 1,04 (2H, d), 1,09 (3H, d), 1,66 - 1,81 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,72 (1H, dd), 2,84 (1H, dd), 2,92 (2H, td), 3,01 (1H, dd), 3,14 (1H, dd), 3,51 - 3,61 (1H, m), 3,68 - 3,83 (2H, m), 4,39 (1H, q), 4,43 (1H, t), 4,52 (1H, t), 4,92 (1H, d), 4,96 (1H, s), 6,29 (1H, d), 6,88 (1H, d), 7,17 (1H, d), 7,40 (1H, dd), 7,82 (1H, d), 8,04 (1H, d), 11,07 (1H, s).	467

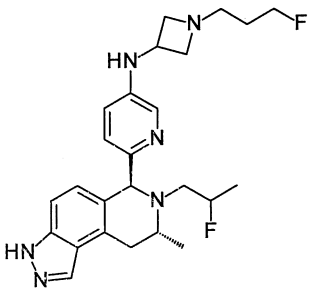
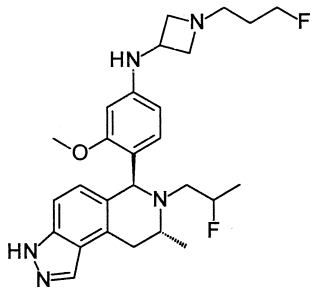
55		5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyrazin-2-amin	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,47 - 0,63 (1H, m), 0,67 - 0,80 (1H, m), 0,81 - 1,01 (2H, m), 1,04 (3H, d), 1,49 - 1,78 (2H, m), 2,45 (2H, t), 2,57 - 2,94 (4H, m), 2,96 - 3,23 (2H, m), 3,47 - 3,71 (3H, m), 4,22 - 4,34 (1H, m), 4,44 (2H, dt), 4,92 (1H, s), 6,82 (1H, d), 7,22 (1H, d), 7,35 (1H, d), 7,78 (1H, d), 7,82 (1H, d), 8,05 (1H, d), 12,94 (1H, br d).	468
56		*N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3,3,3-triflopropyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 0,48 - 0,55 (2H, m), 0,90 - 0,98 (2H, m), 1,09 (3H, d), 2,10 - 2,21 (2H, m), 2,57 - 2,72 (3H, m), 2,85 - 2,92 (3H, m), 3,07 (1H, dd), 3,34 (1H, dd), 3,71 - 3,82 (3H, m), 3,86 (3H, s), 4,07 - 4,14 (1H, m), 5,33 (1H, s), 5,96 (1H, dd), 6,11 (1H, d), 6,75 (1H, d), 6,81 (1H, d), 7,11 (1H, d), 8,05 (1H, d), 10,00 (1H, s).	532

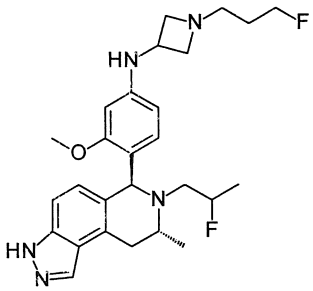
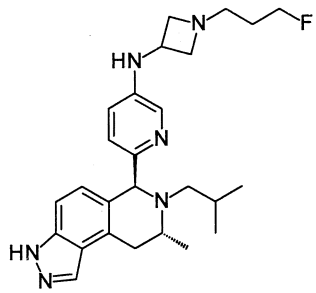
57		6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-N-metylpyriđin-3-amin	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,40 - 0,57 (1H, m), 0,61 - 0,77 (1H, m), 0,78 - 1,00 (2H, m), 1,02 (3H, d), 1,57 - 1,75 (2H, m), 2,42 - 2,48 (2H, m), 2,66 (1H, dd), 2,80 (3H, s), 2,83 - 2,93 (3H, m), 3,00 (1H, dd), 3,19 (1H, br dd), 3,57 - 3,71 (3H, m), 4,04 (1H, quin), 4,45 (2H, dt), 4,88 (1H, s), 6,80 (1H, d), 7,01 - 7,10 (2H, m), 7,19 (1H, d), 7,93 (1H, d), 8,04 (1H, s), 12,93 (1H, s).	481
58		2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,06 (3H, d), 1,65 (2H, dq), 2,61 - 2,71 (1H, m), 2,82 (1H, dd), 2,94 (2H, dd), 3,00 (1H, dd), 3,11 - 3,21 (1H, m), 3,36 - 3,42 (1H, m), 3,64 - 3,74 (4H, m), 4,39 (1H, t), 4,48 (1H, t), 4,80 (1H, p), 5,04 (1H, s), 5,39 (1H, t), 6,84 (1H, d), 7,17 - 7,26 (3H, m), 8,02 - 8,07 (2H, m), 12,97 (1H, s).	490

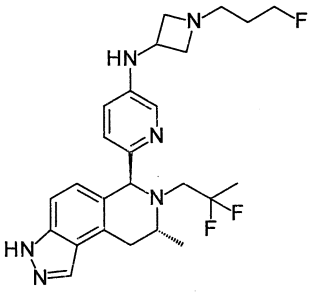
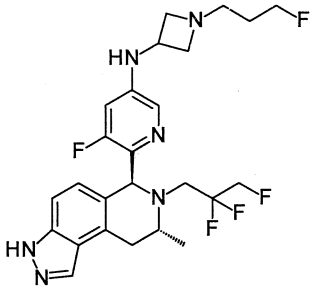
59		2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,17 (3H, d), 1,71 - 1,82 (2H, m), 2,65 (2H, t), 2,79 - 2,95 (3H, m), 3,11 - 3,18 (2H, m), 3,19 - 3,28 (1H, m), 3,33 (1H, dd), 3,68 (1H, td), 3,84 (4H, ddt), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,79 (1H, p), 5,39 (1H, s), 6,75 (1H, d), 6,86 (1H, dd), 7,20 (1H, d), 7,94 (1H, d), 8,06 (1H, d).	508
60		2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,13 (3H, d), 1,39 (1H, h), 1,68 - 1,83 (2H, m), 2,59 (2H, t), 2,82 - 2,99 (4H, m), 3,13 (1H, dt), 3,24 (1H, dd), 3,30 - 3,39 (1H, m), 3,56 - 3,86 (8H, m), 4,09 (1H, p), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,28 (1H, s), 5,98 (1H, dd), 6,11 (1H, d), 6,59 (1H, d), 6,76 (1H, d), 7,16 (1H, d), 8,04 (1H, d).	518
61		2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-1-flo-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,15 (3H, d), 1,66 - 1,88 (2H, m), 2,62 (2H, t), 2,88 (1H, dd), 2,92 - 3,02 (3H, m), 3,14 (1H, dd), 3,22 (1H, td), 3,37 (1H, ddd), 3,67 - 3,73	507

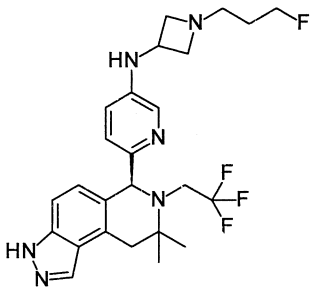
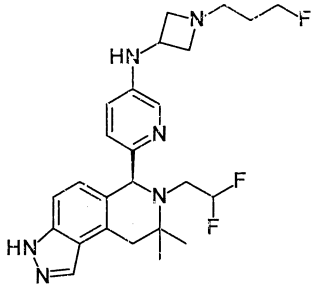
		7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol	(2H, m), 3,76 (1H, td), 3,97 - 4,15 (2H, m), 4,31 (1H, d), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,11 (1H, s), 6,72 (1H, dd), 6,79 (1H, d), 6,87 (1H, d), 7,01 (1H, d), 7,93 (1H, d), 10,19 (1H, s).	
62		2,2-difluoro-3-((6*S*,8*R*)-1-fluoro-6-(6-fluoro-5-((1-(3-fluoropropyl)azetidin-3-yl)amino)pyridin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahydro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,17 (3H, d), 1,68 - 1,84 (2H, m), 2,62 (2H, t), 2,88 (1H, dd), 2,92 - 2,97 (3H, m), 3,08 - 3,16 (1H, m), 3,16 - 3,27 (1H, m), 3,35 - 3,44 (1H, m), 3,71 - 3,78 (2H, m), 3,83 (1H, td), 3,93 - 4,14 (2H, m), 4,38 (1H, d), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,03 (1H, s), 6,59 - 6,79 (2H, m), 6,92 (1H, d), 7,09 (1H, dd), 10,06 (1H, s).	525
63		6-((6*S*,8*R*)-7-(2-fluoro-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-fluoropropyl)azetidin-3-yl)pyridin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,94 (3H, d), 1,13 - 1,27 (6H, m), 1,51 - 1,67 (2H, m), 2,23 - 2,34 (1H, m), 2,61 - 2,77 (4H, m), 2,97 (1H, br dd), 3,40 - 3,48 (1H, m), 3,50 - 3,65 (2H, m), 3,81 - 3,93 (1H, m), 4,38 (2H, dt), 4,80 (1H, s), 6,11 (1H, br d),	469

			6,69 - 6,78 (2H, m), 6,95 (1H, d), 7,12 (1H, d), 7,66 (1H, d), 7,96 (1H, s), 12,86 (1H, s). (Hai hyđro không được quan sát thấy).	
64		N-(4-((6S,8R)-7-(2-flo-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,05 (3H, d), 1,26 (6H, dd), 1,74 (2H, ddd), 2,37 (1H, dd), 2,54 - 2,64 (2H, m), 2,71 - 2,9 (4H, m), 3,26 (1H, d), 3,73 (3H, d), 3,84 (3H, s), 3,93 (1H, s), 4,10 (1H, s), 4,43 (1H, t), 4,53 (1H, t), 5,30 (1H, s), 5,94 (1H, dd), 6,11 (1H, d), 6,67 (1H, d), 6,80 (1H, d), 7,11 (1H, d), 8,04 (1H, d), 10,06 (1H, s).	498
65	 Chất đồng phân A	6-((6*S*,8*R*)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (3H, d), 1,22 (3H, dd), 1,59 - 1,70 (2H, m), 2,65 - 2,86 (4H, m), 3,14 (1H, br dd), 3,48 (1H, sxt), 3,59 - 3,73 (2H, br m), 3,94 (1H, sxt), 4,44 (2H, dt), 4,60 (1H, br dsxt), 4,79 (1H, s), 6,19 (1H, br d), 6,74 (1H, d), 6,78 (1H, dd), 6,93 (1H, d), 7,16 (1H, d), 7,74 (1H, d), 8,03 (1H, s), 12,93 (1H, s). (Ba mức	455

			bội hyđro bị che khuất bởi DMSO).	
66	 Chất đồng phân B	6-((6*S*,8*R*)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (3H, d), 1,13 (3H, dd), 1,56 - 1,70 (2H, m), 2,28 - 2,41 (1H, m), 2,45 (2H, t), 2,72 (2H, q), 2,77 - 2,87 (2H, m), 3,13 (1H, br dd), 3,46 (1H, sxt), 3,56 - 3,66 (2H, m), 3,92 (1H, sxt), 4,44 (2H, dt), 4,55 - 4,72 (1H, m), 4,77 (1H, s), 6,18 (1H, d), 6,73 (1H, d), 6,79 (1H, dd), 6,93 (1H, d), 7,16 (1H, d), 7,75 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,92 (1H, s)	455
67	 Chất đồng phân A	1-(3-flopropyl)-*N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxypheny l)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,01 (3H, d), 1,29 (3H, dd), 1,56 - 1,76 (2H, m), 2,43 - 2,49 (1H, m), 2,57 - 2,66 (1H, m), 2,69 - 2,89 (3H, m), 3,06 (1H, br dd), 3,35 - 3,42 (1H, m), 3,63 - 3,74 (2H, m), 3,81 (3H, s), 3,89 - 3,99 (1H, m), 4,45 (2H, dt), 4,70 - 4,91 (1H, m), 5,17 (1H, s), 5,88 (1H, dd), 6,00 (1H, br d), 6,18 (1H, d), 6,32 (1H, d), 6,69 (1H, d), 7,19 (1H, d), 8,03 (1H, s),	484

			12,93 (1H, s). (Hai mức bội hyđro bị che khuất bởi DMSO).	
68	 Chất đồng phân B	1-(3-flopropyl)-*N*-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flopropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)azetiđin-3-amin	^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,00 (3H, d), 1,14 (3H, dd), 1,57 - 1,73 (2H, m), 2,20 - 2,33 (1H, m), 2,42 - 2,48 (2H, m), 2,68 - 2,83 (4H, m), 3,11 (1H, br dd), 3,37 - 3,47 (1H, m), 3,59 - 3,66 (2H, m), 3,81 (3H, s), 3,92 (1H, sxt), 4,45 (2H, dt), 4,63 - 4,84 (1H, m), 5,14 (1H, s), 5,91 (1H, dd), 5,98 (1H, d), 6,18 (1H, d), 6,42 (1H, d), 6,65 (1H, d), 7,16 (1H, d), 8,02 (1H, s), 12,93 (1H, s)	484
69		*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-7-isobutyl-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 0,73 (3H, d), 0,81 (3H, d), 0,97 (3H, d), 1,51 - 1,81 (3H, m), 1,99 (1H, dd), 2,34 (1H, dd), 2,42 - 2,48 (2H, m), 2,74 (2H, td), 2,85 (1H, dd), 3,09 - 3,22 (1H, m), 3,37 - 3,54 (1H, m), 3,56 - 3,71 (2H, m), 3,93 (1H, sxt), 4,45 (2H, dt), 4,69 (1H, s), 6,12 (1H, d), 6,72 - 6,84 (2H, m), 6,94 (1H, d), 7,16 (1H, d),	451

			7,75 (1H, d), 8,03 (1H, s), 12,90 (1H, s).	
70		6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-difluoropropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-fluoropropyl)azetidin-3-yl)pyridin-3-amin	^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 27°C) 1,07 (3H, d), 1,58 (3H, br t), 1,80 - 2,05 (2H, m), 2,53 - 2,72 (1H, m), 2,86 (1H, br dd), 2,98 - 3,27 (3H, m), 3,43 - 3,54 (1H, m), 3,87 (1H, br s), 4,06 (1H, br d), 4,22 - 4,50 (3H, m), 4,52 - 4,65 (2H, m), 4,99 (1H, br s), 6,56 (1H, br s), 6,80 (1H, d), 6,86 - 7,20 (2H, m), 7,24 (1H, br d), 7,73 - 7,88 (1H, m), 8,08 (1H, s), 9,54 - 10,04 (1H, m), 12,99 (1H, br s)	473
71		5-flo-*N*-(1-(3-fluoropropyl)azetidin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,3-trifluoropropyl)-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyridin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, DMSO, 27°C) 1,04 (3H, d), 1,64 (2H, dq), 2,44 (2H, t), 2,66 - 2,84 (4H, m), 2,97 (1H, dd), 3,15 - 3,26 (1H, m), 3,56 - 3,64 (3H, m), 3,94 (1H, h), 4,39 (1H, t), 4,48 (1H, t), 4,56 - 4,82 (2H, m), 5,19 (1H, s), 6,61 (1H, d), 6,66 - 6,73 (2H, m), 7,20 (1H, d), 7,55 (1H, dd), 8,04 (1H, s), 12,95 (1H, s).	509

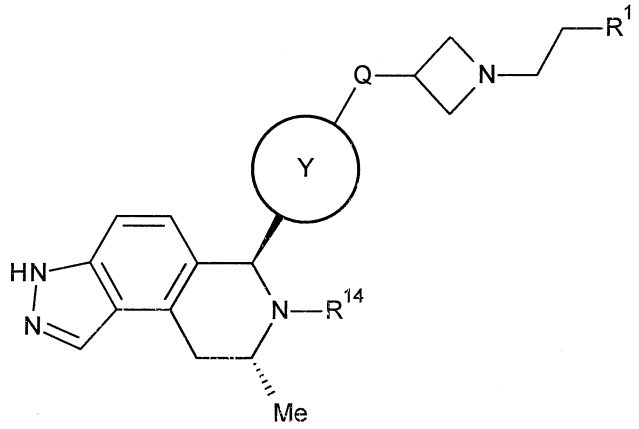
72		(*S*)-6-(8,8-đimetyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,06 (3H, s), 1,41 (3H, s), 1,66 - 1,83 (2H, m), 2,61 (2H, t), 2,93 (3H, dt), 3,13 - 3,36 (2H, m), 3,36 - 3,56 (1H, m), 3,71 (2H, q), 4,10 (2H, d), 4,44 (1H, t), 4,53 (1H, t), 4,98 (1H, s), 6,72 (1H, dd), 6,77 (1H, d), 6,98 (1H, d), 7,11 (1H, d), 7,83 (1H, d), 8,04 (1H, d), 10,72 (1H, s).	491
73		(*S*)-6-(7-(2,2-đifloetyl)-8,8-đimetyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 27°C) 1,04 (3H, s), 1,41 (3H, s), 2,85 - 2,95 (6H, m), 3,21 (2H, t), 3,21 - 3,35 (2H, m), 3,52 (2H, t), 4,01 (2H, q), 4,44 (1H, t), 4,55 (1H, t), 4,82 (1H, dt), 4,96 (1H, s), 6,72 (1H, dd), 7,07 (1H, dd), 7,09 - 7,13 (2H, m), 8,04 (1H, s), 8,20 (1H, s), 10,65 (1H, s).	473

Phần mô tả các phương án minh họa ở trên được dự định chỉ để thông tin cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế của Người nộp đơn, các nguyên tắc của nó, và các ứng dụng thực tế của nó sao cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng phỏng theo và áp dụng bản mô tả theo nhiều dạng, khi chúng có thể được làm cho phù hợp nhất với các yêu cầu của việc sử dụng cụ thể. Phần mô tả này và các ví dụ cụ thể của nó, khi chỉ ra các phương án của sáng chế, được dự định là chỉ nhằm mục đích minh họa.

Sáng chế, do đó, không chỉ giới hạn ở các phương án minh họa được mô tả trong bản mô tả này, và có thể được cải biến theo nhiều cách. Ngoài ra, cần hiểu rõ rằng các dấu hiệu khác nhau của sáng chế mà, để cho rõ ràng, được mô tả trong nội dung của các phương án riêng rẽ, cũng có thể được kết hợp để tạo thành một phương án đơn lẻ. Ngược lại, các dấu hiệu khác nhau của sáng chế mà, để cho ngắn gọn, được mô tả trong nội dung của một phương án đơn lẻ, cũng có thể được kết hợp để tạo thành dạng kết hợp con của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (ID):



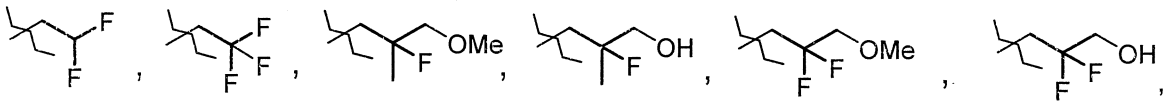
(ID)

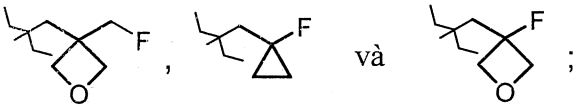
trong đó:

Q là O hoặc NH;

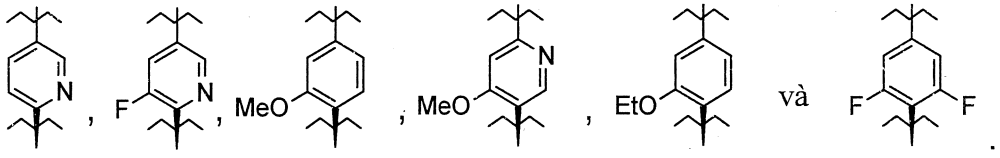
R^1 là CH_2F hoặc CHF_2;

R^{14} được chọn từ nhóm gồm có:





và Vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



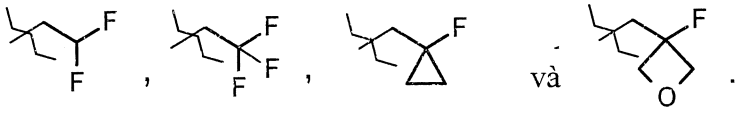
hoặc muối dược dụng của nó.

2. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm 1 hoặc muối dược dụng của nó, trong đó Q là NH.

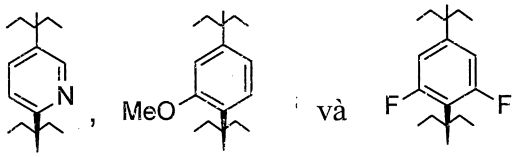
3. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm 1 hoặc muối dược dụng nó, trong đó Q là O.

4. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên hoặc muối dược dụng của nó, trong đó R^1 là CH_2F.

5. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên hoặc muối dược dụng nó, trong đó R^{14} được chọn từ nhóm gồm có:



6. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên hoặc muối dược dụng nó, trong đó vòng Y được chọn từ nhóm gồm có:



7. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm 1 hoặc muối dược dụng nó, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm gồm có:

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-điflo-3-metoxypropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

6-((6*S*,8*R*)-7-((1-flocyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)phenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)-2,2-điflopropan-1-ol;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

(6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;

N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloethyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

5-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-4-metoxypyriđin-2-amin;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-((3-(flometyl)oxetan-3-yl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

N-(3,5-điflo-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

(6*S*,8*R*)-7-(2-flo-3-metoxy-2-metylpropyl)-6-(4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yloxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin;

2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloethyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

5-flo-6-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

N-(3-etoxy-4-((6*S*,8*R*)-7-((1-floxyclopropyl)metyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)phenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

N-(4-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-3-metoxyphenyl)-1-(3-flopropyl)azetiđin-3-amin;

(6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;

3-((6*S*,8*R*)-6-(2,6-điflo-4-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-ylamino)phenyl)-8-metyl-8,9-đihyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-7(6*H*)-yl)-2-flo-2-metylpropan-1-ol;

6-((6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)pyriđin-3-amin;

(6*S*,8*R*)-7-(2,2-đifloetyl)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin;

1-(3-flopropyl)-*N*-(3-metoxy-4-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3*H*-pyrazolo[4,3-*f*]isoquinolin-6-yl)phenyl)azetiđin-3-amin;

5-flo-*N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

2,2-điflo-3-((6*S*,8*R*)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

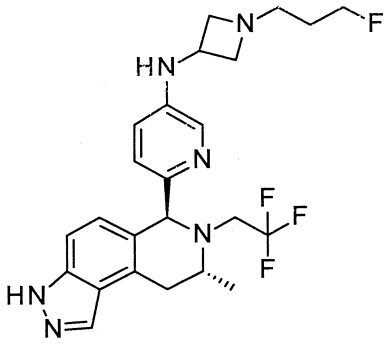
N-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6S,8R)-1-đoteri-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-6-(5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol;

2,2-điflo-3-((6S,8R)-6-(3-flo-5-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)oxy)pyriđin-2-yl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol; và

2,2-điflo-3-((6S,8R)-6-(4-((1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)amino)-2-metoxyphenyl)-8-metyl-3,6,8,9-tetrahyđro-7H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-7-yl)propan-1-ol.

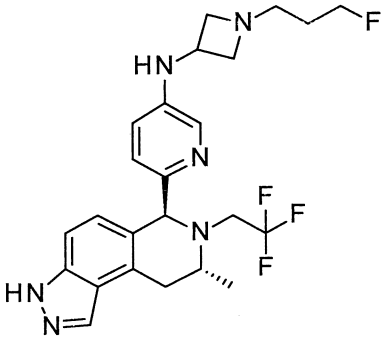
8. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm 1 hoặc muối dược dụng của nó, trong đó hợp chất này là *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin:



,

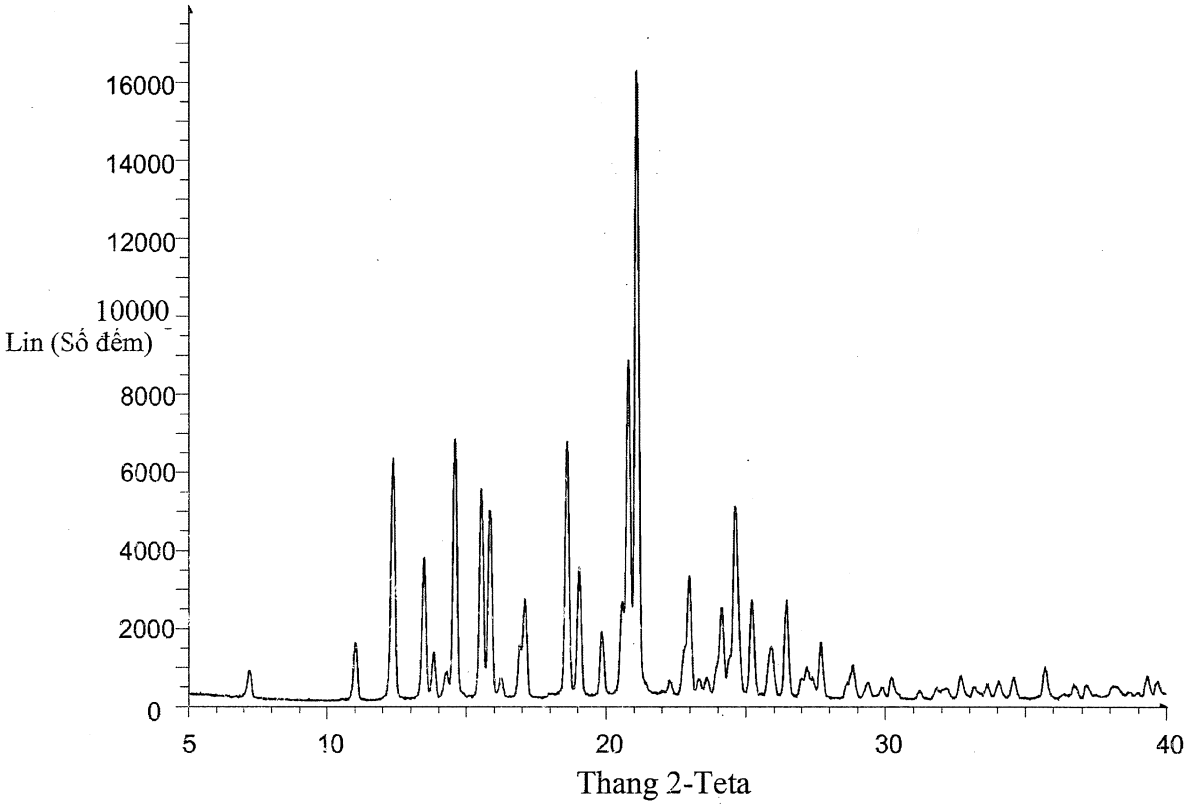
hoặc muối dược dụng của nó.

9. Hợp chất có công thức (ID) theo điểm 1, trong đó hợp chất này là *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin:

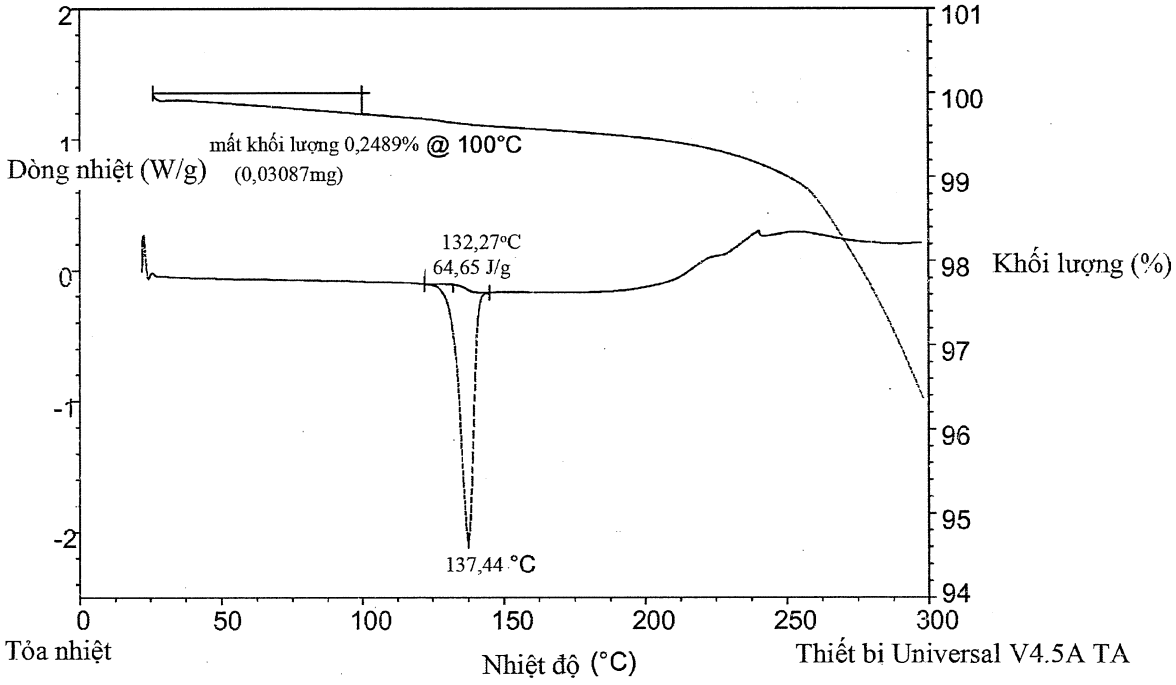


10. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (ID) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 hoặc muối dược dụng của nó và tá dược dược dụng.

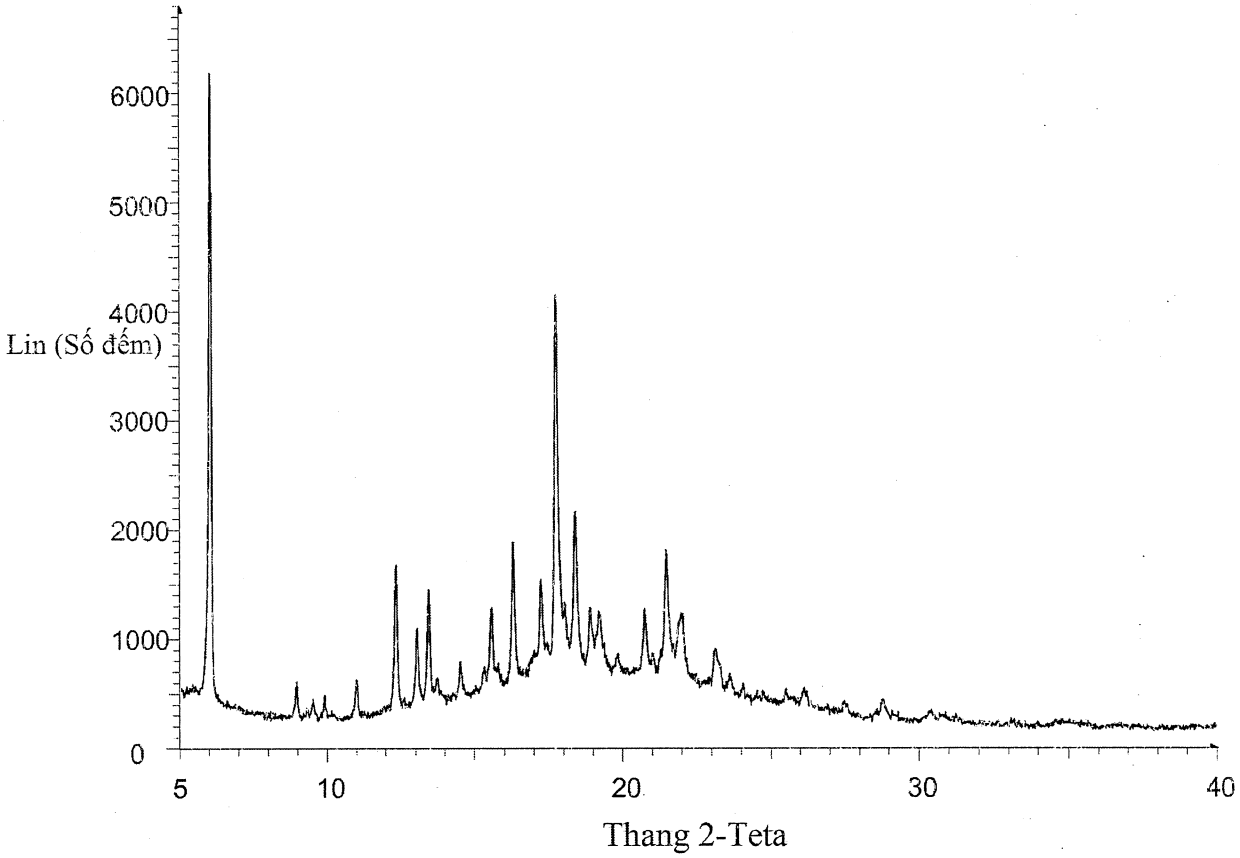
Hình 1: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng A của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



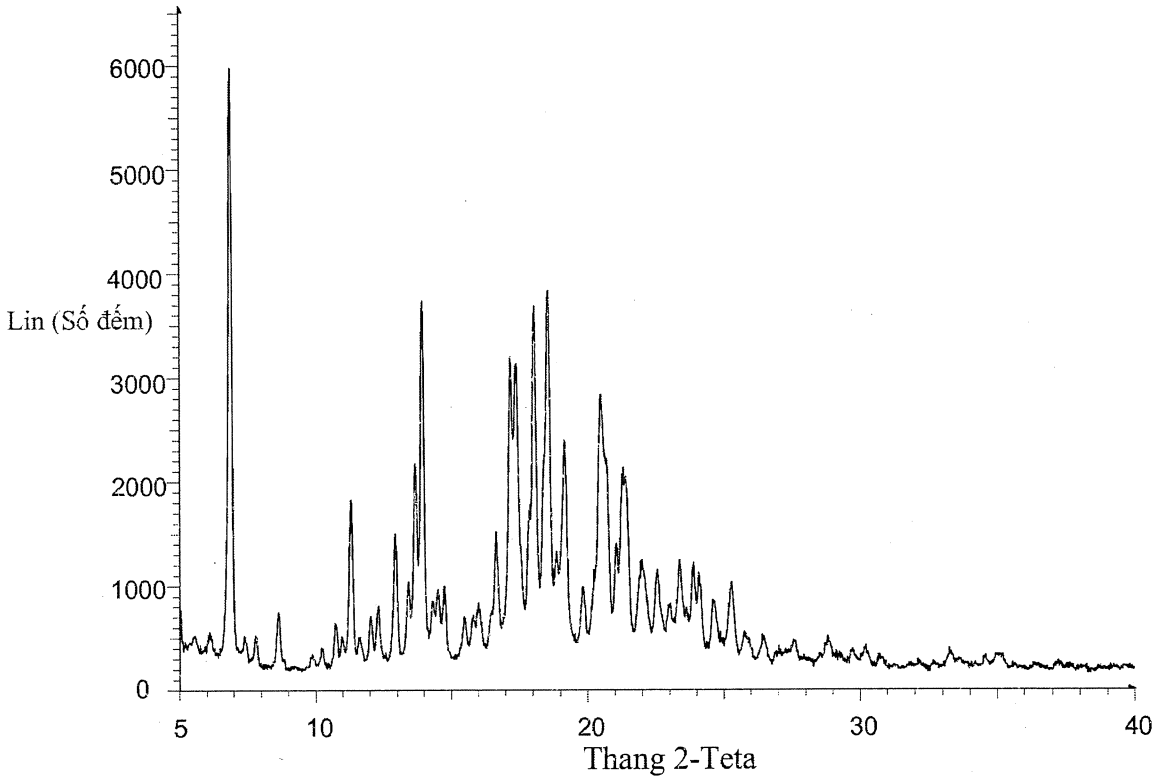
Hình 2: Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng A của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



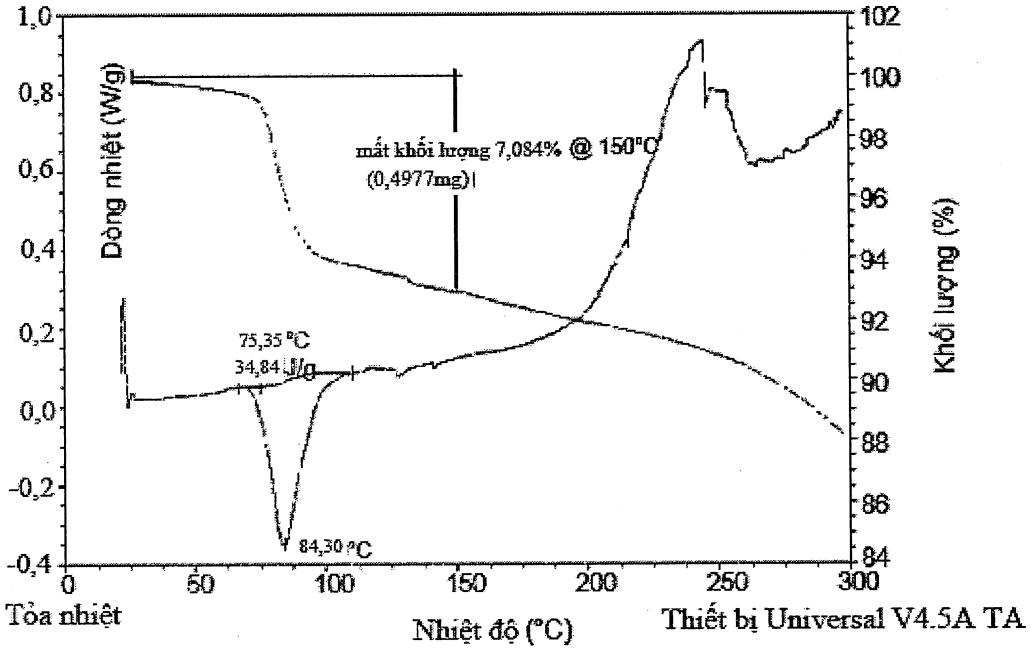
Hình 3: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng B của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



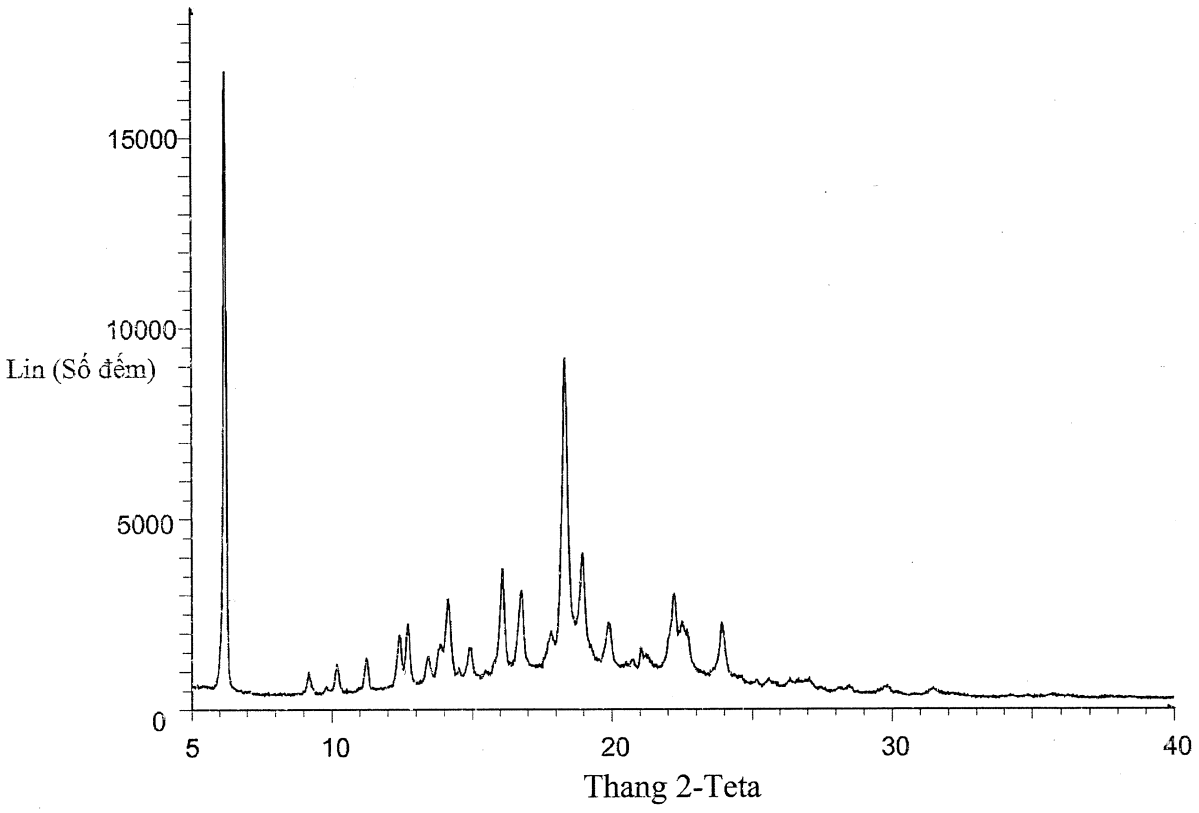
Hình 4: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng C của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



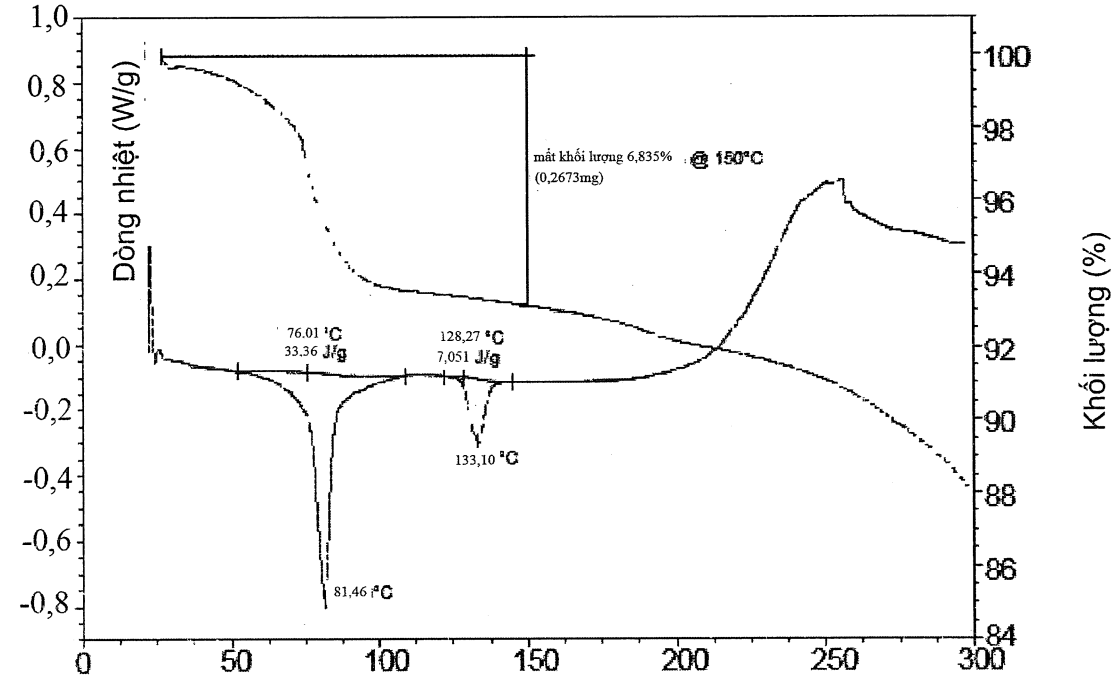
Hình 5: Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng C của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



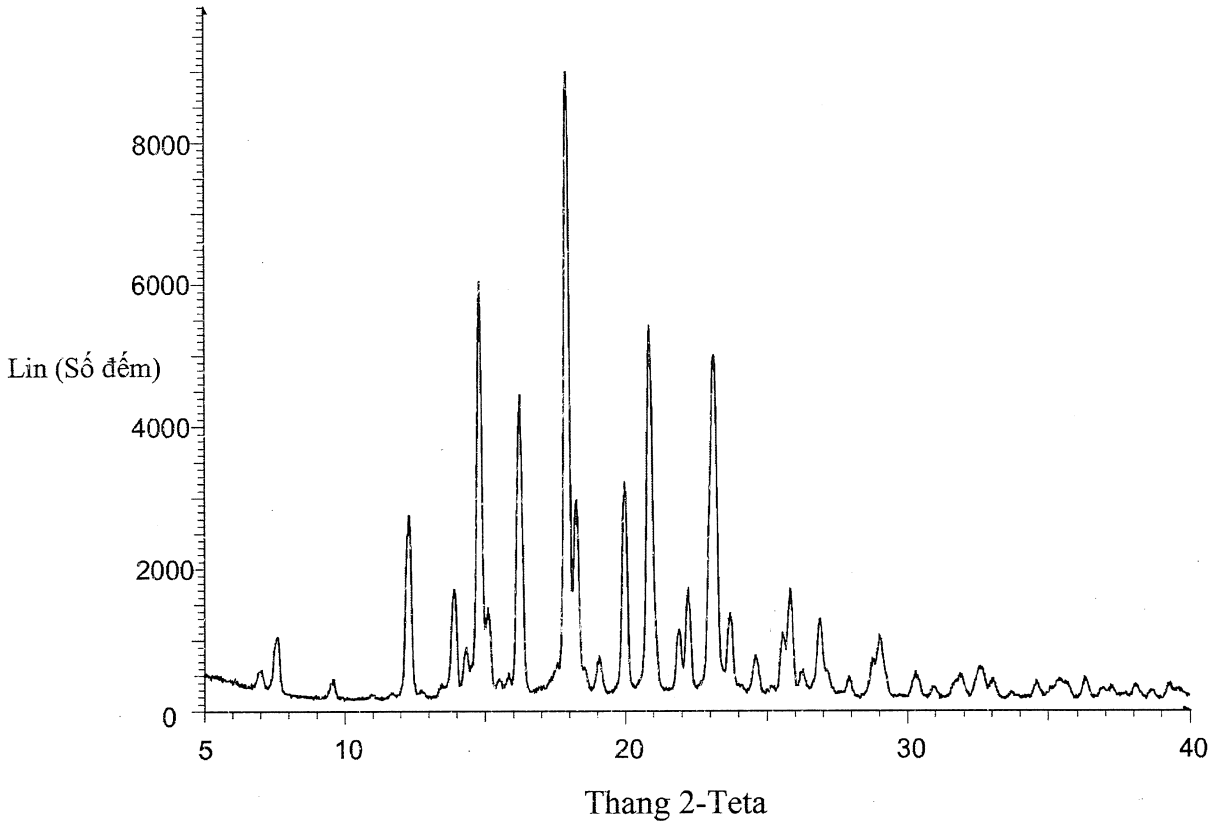
Hình 6: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng D của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



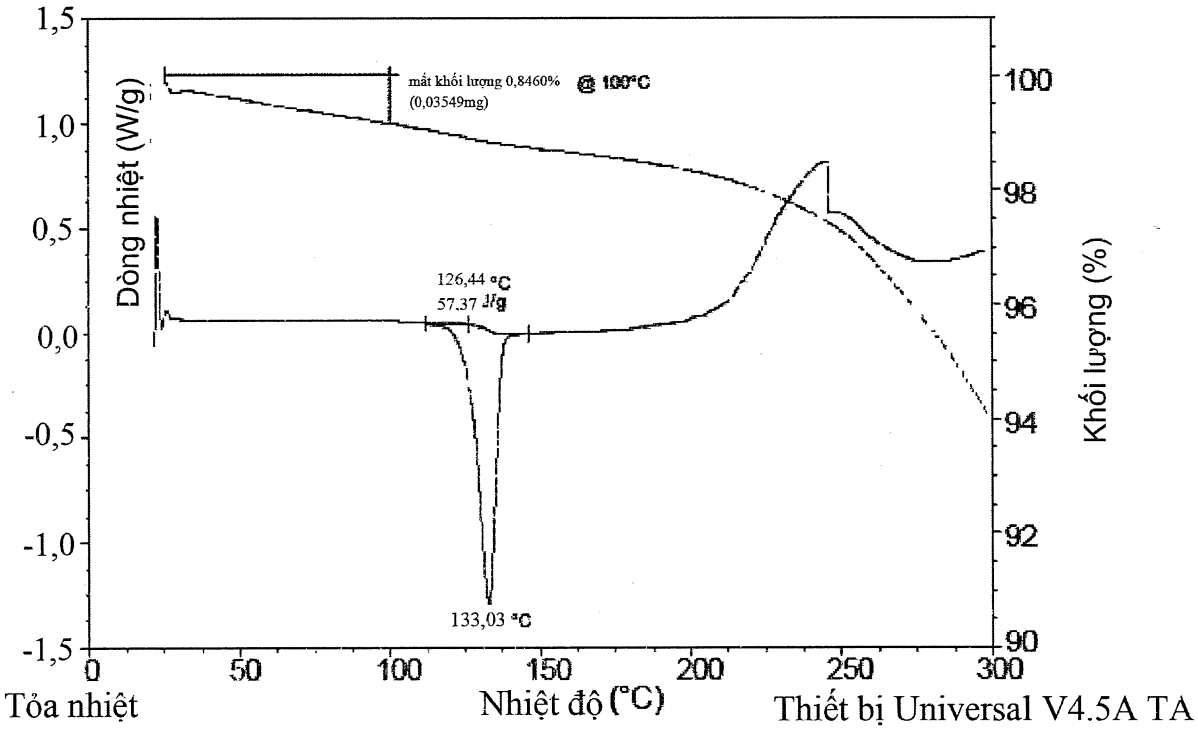
Hình 7: Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng D của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



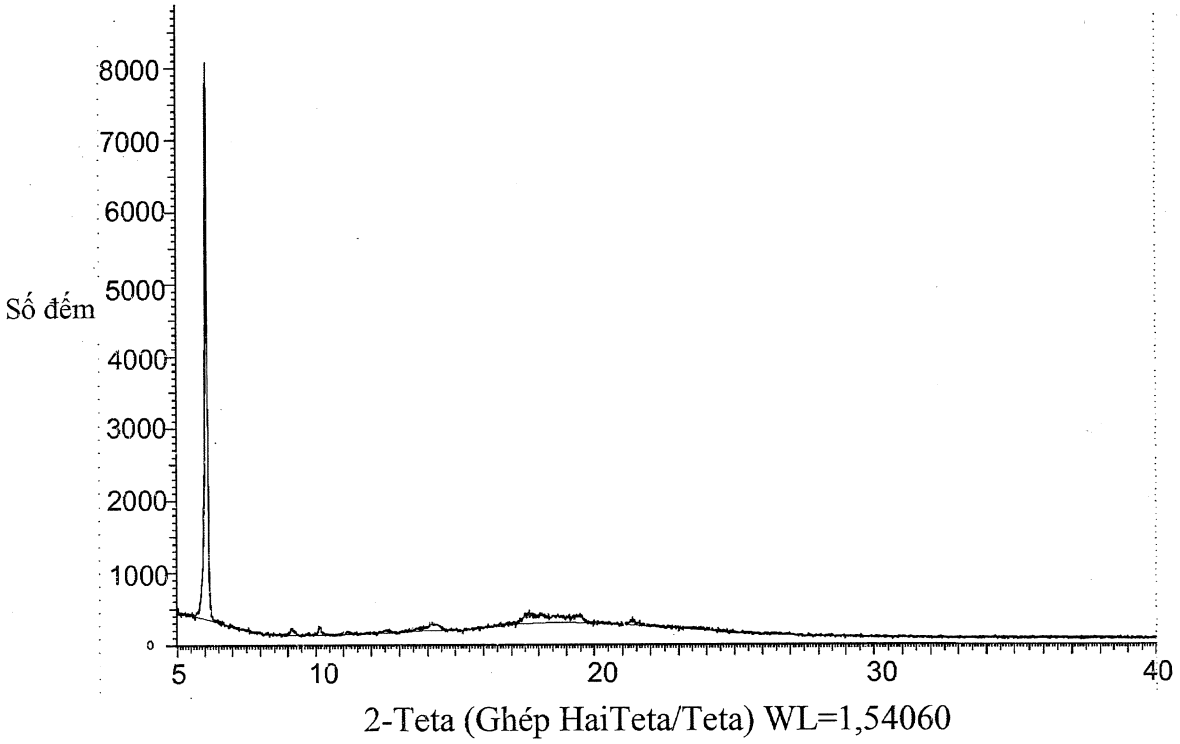
Hình 8: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng E của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



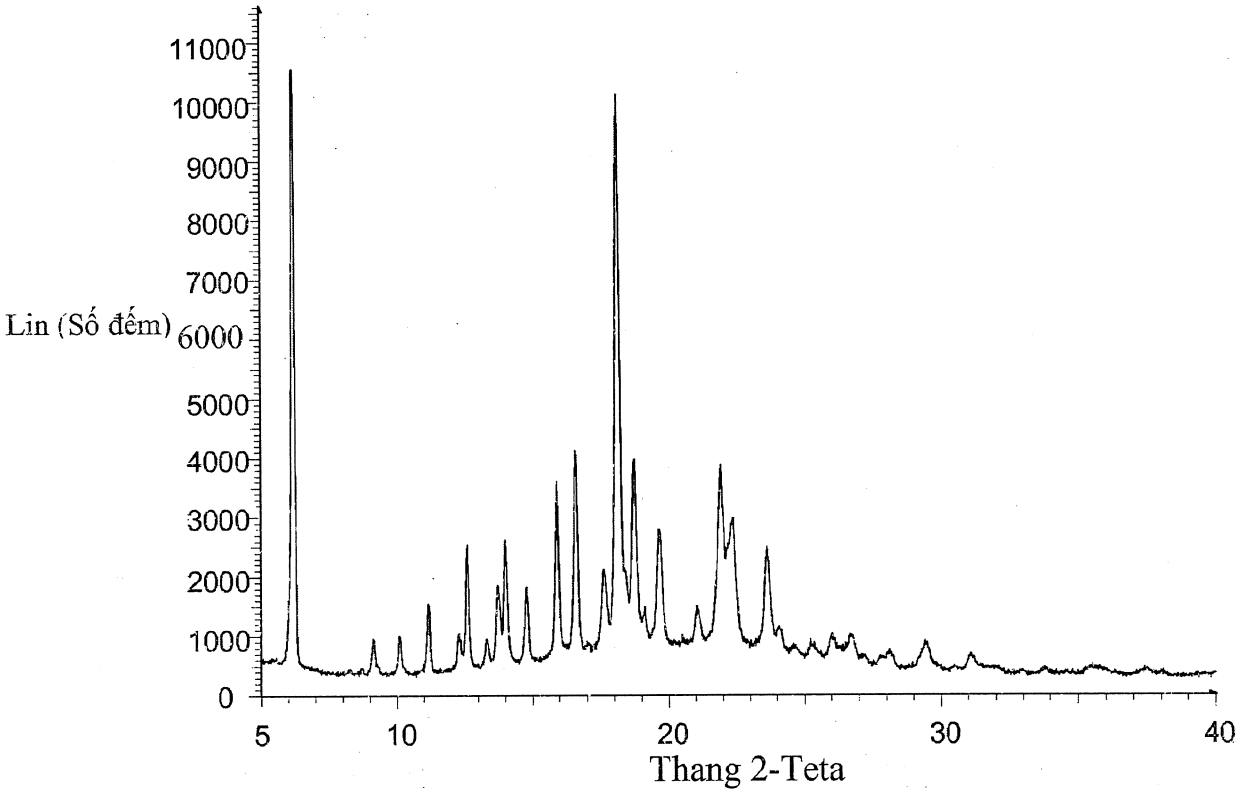
Hình 9: Biểu đồ nhiệt DSC/TGA đối với Dạng E của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



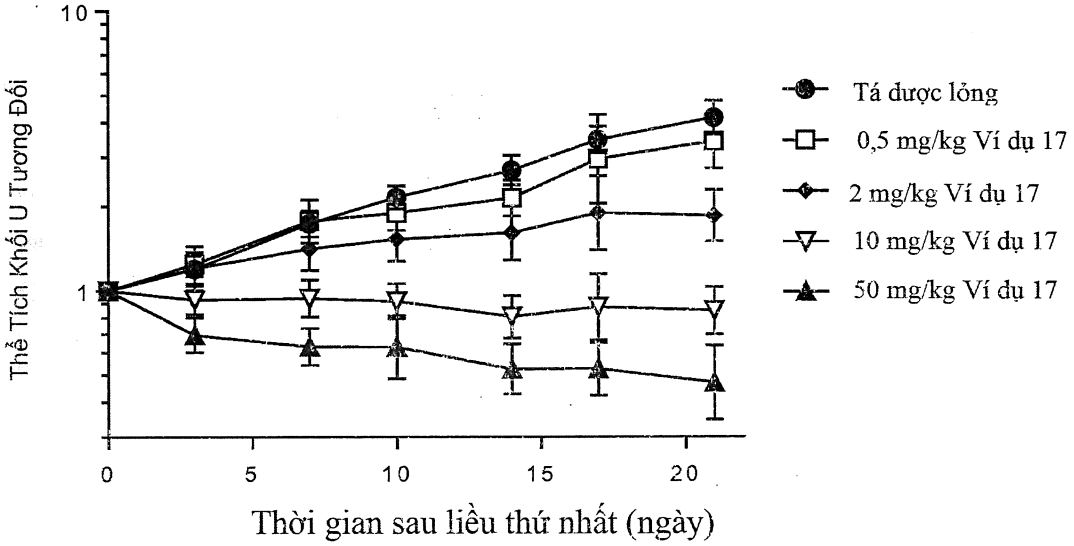
Hình 10: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng F của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



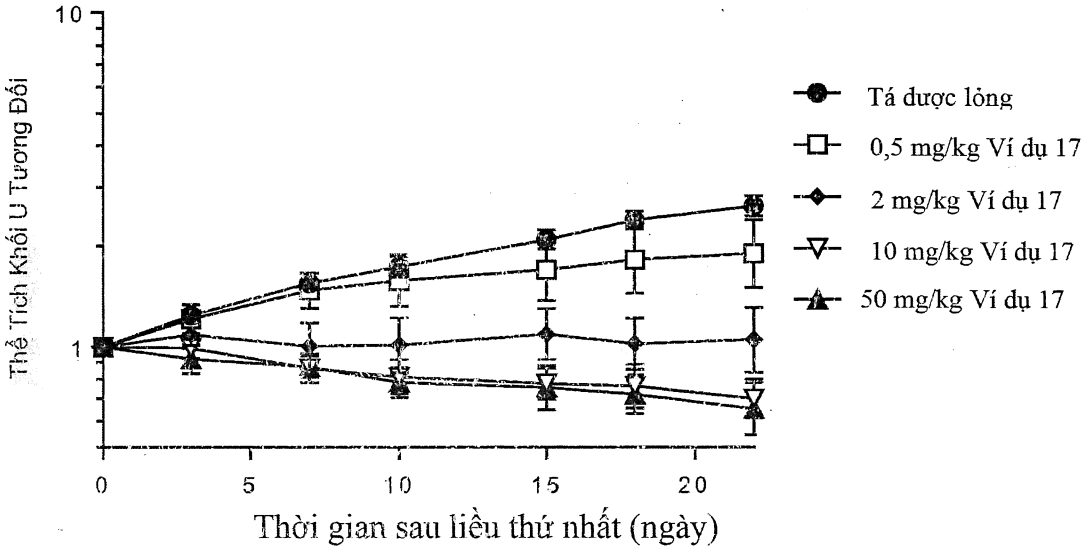
Hình 11: Mẫu nhiễu xạ bột tia X đối với Dạng G của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



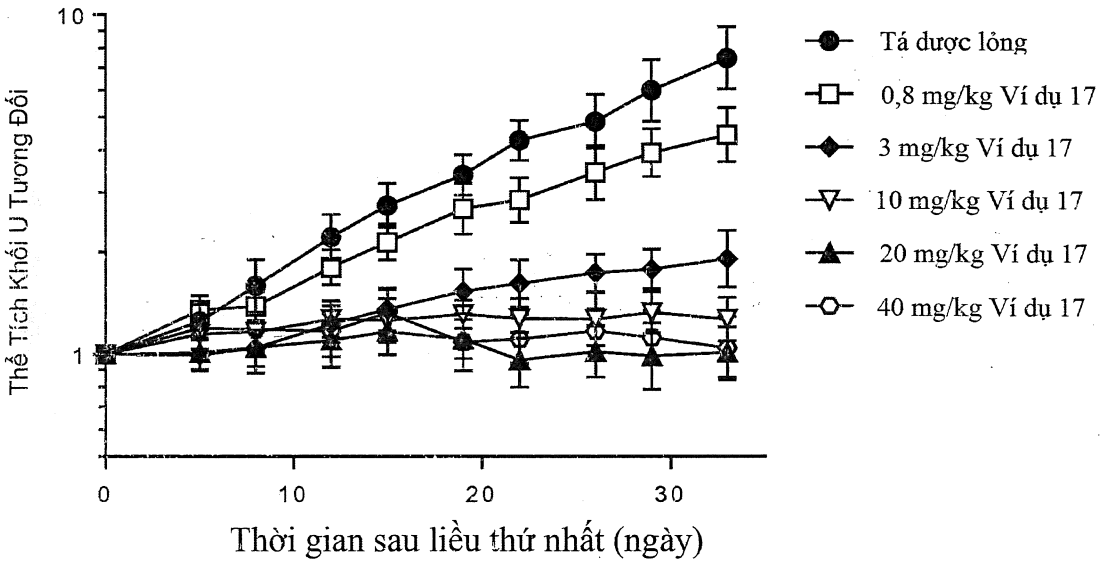
Hình 12: Kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài MCF7 gốc người ở chuột bằng *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



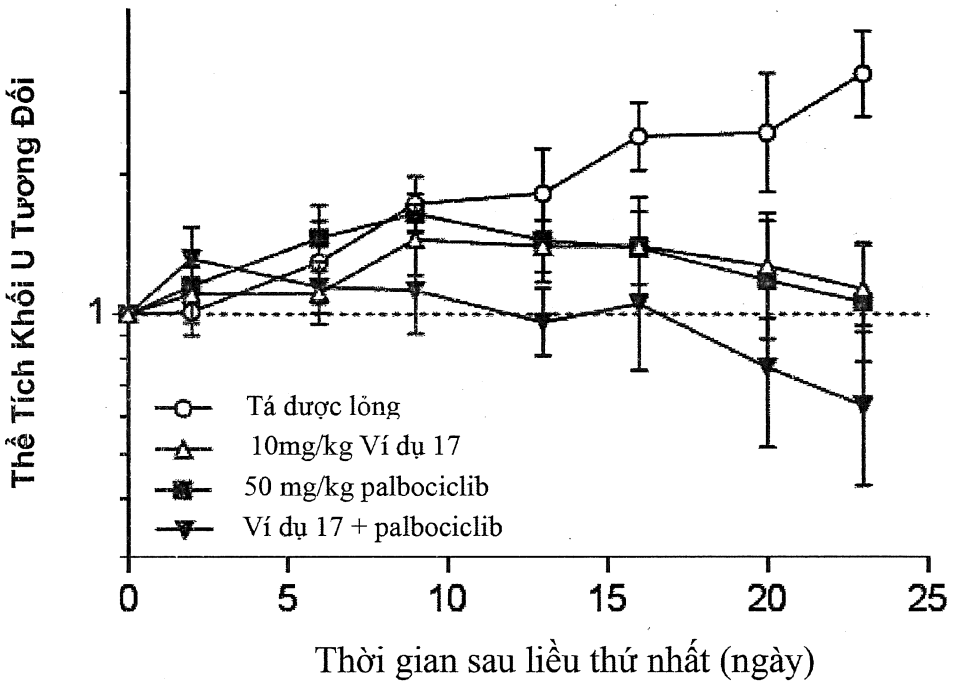
Hình 13: Kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài MCF7 đột biến Y537S ESR1 của người ở chuột bằng *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



Hình 14: Kết quả của của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài CTC174 có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người ở chuột bằng *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin



Hình 15: Kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài CTC174 có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người ở chuột bằng dược phẩm kết hợp của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin và palbociclib



Hình 16: Kết quả của nghiên cứu hiệu quả kháng khối u mảnh ghép khác loài CTC174 có nguồn gốc từ bệnh nhân ung thư vú đột biến ESR1 của người ở chuột bằng dược phẩm kết hợp của *N*-(1-(3-flopropyl)azetiđin-3-yl)-6-((6*S*,8*R*)-8-metyl-7-(2,2,2-trifloetyl)-6,7,8,9-tetrahyđro-3H-pyrazolo[4,3-f]isoquinolin-6-yl)pyriđin-3-amin và vistusertib (AZD2014)

