



(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)



1-0037840

(51)⁷ C07D 213/00; A61K 31/4412; A61K 31/444; A61K 31/505; A61P 35/00; A61K 31/435; C07D 401/00; C07D 401/14; C07D 403/14; C07D 413/14; C07D 417/14 (13) B

(21) 1-2019-02764

(22) 27/10/2017

(86) PCT/CN2017/107964 27/10/2017

(87) WO 2018/077227 03/05/2018

(30) 201610954377.X 27/10/2016 CN

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/10/2019 379A

(73) FUJIAN AKEYLINK BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

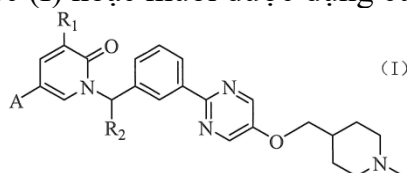
2F, Comprehensive Office Building, Building 1-7, Fuyuan Industrial Zone, Zherong County Ningde, Fujian 355300, China

(72) XU, Xiongbín (CN); LI, Gang (CN); DING, Charles Z. (US); HU, Lihong (CN); HU, Guoping (CN); LI, Jian (US); CHEN, Shuhui (US); CHI, Zhigang (CN); WANG, Kun (CN).

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

(54) HỢP CHẤT PYRIDON DÙNG LÀM CHẤT ỨC CHẾ C-MET VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pyridon dùng làm chất ức chế c-Met, và được bộc lộ cụ thể là hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lớp hợp chất pyridon dùng làm chất ức chế c-Met, được bộc lộ cụ thể là hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

c-Met được mã hóa bởi tiền gen sinh ung thư Met là một tyrosin kinaza thụ thể có mức liên kết cao thuộc phân nhóm RON. Nó là thụ thể đã biết duy nhất đối với yếu tố tán xạ hoặc yếu tố sinh trưởng tế bào gan (hepatocyte growth factor: HGF). Protein c-Met là dimer khác loại được liên kết bởi disulfua gồm cấu trúc dưới phân tử α 50kD và cấu trúc dưới phân tử β 145kD, dimer này có thể được chia thành vùng ngoại bào và vùng nội bào. Vùng ngoại bào chứa ba vùng cấu trúc với chức năng khác nhau: vùng liên kết với phối tử đầu tận cùng N (vùng SEMA) bao phủ toàn bộ chuỗi α và một phần chuỗi β , vùng giàu xystin với bốn liên kết disulfua bảo toàn, và vùng kiểu globulin miễn dịch. Vùng nội bào cũng gồm ba vùng điều hòa: vùng cận màng với vị trí phosphoryl hóa Tyr1003, vùng xúc tác tyrosin kinaza với các vị trí phosphoryl hóa Tyr1234 và Tyr1235, và vùng liên kết đa năng đầu tận cùng C với tyrosin liên kết với Tyr1349 và Tyr1356.

HGF cảm ứng quá trình phosphoryl hóa c-Met bằng cách liên kết với vùng ngoại bào của nó, và tuyển chọn nhiều yếu tố kế như GAB1 (growth factor receptor binding protein-1) và GAB2 (growth factor receptor binding protein-2) trong vùng đa năng đầu tận cùng C, vùng này còn thu hút các phân tử như SHP2, PI3K và các phân tử khác để liên kết vào đây, do đó hoạt hóa các con đường RAS/MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT, v.v., nhờ đó điều hòa sự sinh trưởng, sự di chuyển, sự tăng sinh và sự sống sót của tế bào. Hoạt động bất thường của con đường c-Met có thể dẫn đến sự phát sinh khối u và sự di căn, do mức biểu hiện cao bất thường của c-Met đã được phát hiện trong nhiều bệnh ác tính ở người như bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư

phổi và bệnh ung thư vú. Ngoài ra, c-Met cũng liên quan đến tính kháng thuốc trị khối u đối với nhiều chất ức chế kinaza.

Tương tác giữa c-Met và các thụ thể màng khác nhau (tương tác) cấu thành hệ thống mạng phức tạp. Tương tác giữa c-Met và thụ thể dính bám CD44 khuếch đại đáp ứng của peptit tín hiệu; tương tác giữa c-Met và thụ thể protein não hoạt hóa mức c-Met của phổi tử độc lập HGF, và tiếp theo tăng cường hiệu quả xâm nhập; tương tác giữa c-Met và thụ thể tiền gây chết tế bào theo chương trình FAS thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình; các tương tác giữa c-Met và các tyrosin kinaza thụ thể như EGFR, VEGFR điều hòa quá trình hoạt hóa lẫn nhau, do đó quá trình tạo mạch bị ảnh hưởng. Tương tác giữa c-Met và các thụ thể màng này thúc đẩy sự phát sinh khối u, sự di căn và cảm ứng tính kháng thuốc.

Yếu tố phiên mã HIF-1 α là yếu tố điều hòa chính đối với các tế bào khối u thích nghi với stress môi trường giảm oxy huyết. Các chất ức chế VEGFR khiến cho khối u giảm oxy huyết ở giai đoạn đầu điều trị. Trong môi trường giảm oxy huyết, HIF-1 α điều hòa tăng mức c-Met, sự gia tăng nồng độ c-Met theo cách này thúc đẩy tế bào khối u di căn, tạo ra sự mở rộng hoặc di căn vùng của khối u, dẫn đến khối u thoát khỏi môi trường thiếu oxy và tiếp theo xây dựng hệ thống nhân dòng vô tính có khả năng sinh trưởng xâm lấn cao hơn và mạnh hơn. Tính kháng thuốc của khối u đối với các chất ức chế EGFR có thể liên quan đến sự điều hòa tăng mức phối tử HGF. Sự gia tăng c-Met được phát hiện ở 4% - 20% bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ kháng Gefitinib và Erlotinib, HGF phát triển tính kháng các chất ức chế kinaza EGFR bằng cách sử dụng GAB1 để điều hòa con đường PI3K/AKT và ERK. Trong các dòng tế bào u hắc sắc tố BRAF bị đột biến, các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra rằng sự gia tăng HGF có thể kháng tác dụng của chất ức chế BRAF là Ramurafenib. Do đó, tương tác giữa c-Met và các thụ thể màng cảm ứng tính kháng liệu pháp đích kinaza.

Hiện nay, có nhiều thuốc kháng khối u trên thị trường, như thuốc alkyl hóa, thuốc kháng chất chuyển hóa, chất kháng sinh kháng khối u và các chất điều biến miễn dịch, v.v., song hầu hết các thuốc này đều không dung nạp do độc tính cao của chúng. Bằng nghiên cứu chuyên sâu về sinh học phân tử khối u, cơ chế phân tử của sự phát sinh và phát triển khối u đã được phát hiện nhiều hơn và rõ ràng hơn, và liệu pháp nhắm đích

phân tử đối với nhiều khối u ác tính đã thu hút sự quan tâm rộng rãi. Các thuốc nhắm đích phân tử có tính chọn lọc cao hơn và có hiệu quả phổ rộng, chúng an toàn hơn so với các thuốc hóa trị gây độc tế bào, do đó chỉ ra hướng phát triển mới trong lĩnh vực điều trị bệnh ung thư.

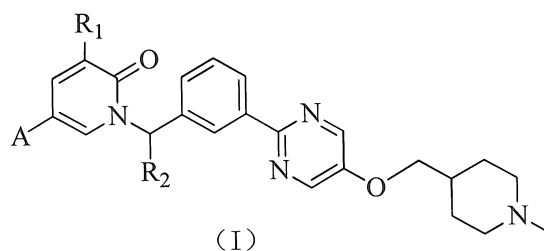
Hiện có hai loại thuốc kháng khối u nhắm đích tại con đường c-Met: một loại là kháng thể đơn dòng kháng HGF hoặc c-Met; loại còn lại là chất ức chế phân tử nhỏ kháng c-Met. Các chất ức chế phân tử nhỏ đã vào giai đoạn nghiên cứu lâm sàng hoặc đang nghiên cứu bao gồm PF-2341066, EMD-1214063, XL-184 và ARQ-197 v.v..

Trong số đó, Tepotinib (EMD1214063) (WO2009006959, ngày công bố 2009.1.15) có hoạt tính chống ung thư tốt nhất, nó có hiệu quả ức chế cao đối với nhiều tế bào khối u biểu hiện c-Met quá mức (hoạt tính enzym c-Met $IC_{50}=3,67nM$, tế bào MHCC97H $IC_{50}=6,2nM$), đã vào nghiên cứu lâm sàng giai đoạn II.

Tuy nhiên, mặc dù Tepotinib (EMD1214063) có tính chọn lọc cao, nhược điểm của nó là độ ổn định chuyển hóa thấp và tỷ lệ thanh thải cao in vivo. Do đó, rất cần có các chất ức chế c-Met ổn định chuyển hóa để bù đắp nhược điểm này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của nó,



R_1 được chọn từ H hoặc F;

R_2 được chọn từ H hoặc CH_3 ;

trong khi R_2 không phải là H, cấu hình của nguyên tử cacbon gắn với R_2 là R hoặc S;

A được chọn từ nhóm gồm phenyl, pyridyl, pyrazolyl, isoxazolyl, isothiazolyl và thiazolyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_3 ;

R_3 được chọn từ CN, halogen, $C(=O)NH_2$, hoặc được chọn từ nhóm gồm C_{1-6} alkyl, C_{1-6} heteroalkyl, và C_{3-6} xycloalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_0 ;

R_0 được chọn từ F, Cl, Br, I, OH, CN, NH_2 , $C(=O)NH_2$, hoặc được chọn từ nhóm gồm C_{1-3} alkyl và C_{1-3} heteroalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R' ;

R' được chọn từ F, Cl, Br, I, CN, OH, NH_2 , CH_3 , CH_3CH_2 , CF_3 , CHF_2 hoặc CH_2F .

“hetero” trong C_{1-3} heteroalkyl hoặc C_{1-6} heteroalkyl được chọn từ nhóm gồm -O-, - $C(=O)NR'$ -, - $C(=O)NH$ -, - NR' -, và -NH-;

trong trường hợp bất kỳ trên đây, số nguyên tử khác loại hoặc nhóm nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ 1, 2 hoặc 3.

Theo một số phương án của sáng chế, R_0 được chọn từ F, Cl, Br, I, OH, CN, NH_2 , $C(=O)NH_2$, CH_3 , CH_3CH_2 , CF_3 , CHF_2 , CH_2F , NH_2CH_2 , $(NH_2)_2CH$, CH_3O , CH_3CH_2O , CH_3OCH_2 , CH_3NH hoặc $(CH_3)_2N$.

Theo một số phương án của sáng chế, R_1 là H.

Theo một số phương án của sáng chế, R_1 là F.

Theo một số phương án của sáng chế, R_2 là H.

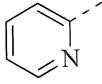
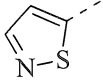
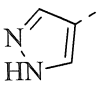
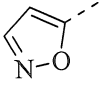
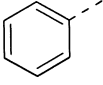
Theo một số phương án của sáng chế, R_2 là CH_3 .

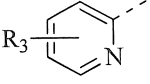
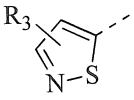
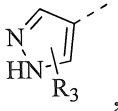
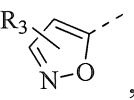
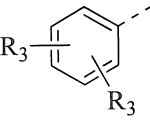
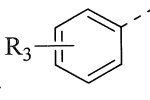
Theo một số phương án của sáng chế, cấu hình của nguyên tử cacbon gắn với R_2 là R.

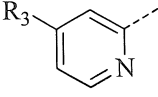
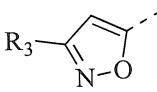
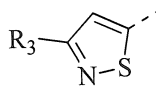
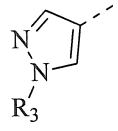
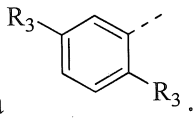
Theo một số phương án của sáng chế, cấu hình của nguyên tử cacbon gắn với R_2 là S.

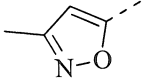
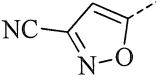
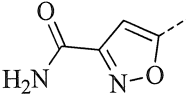
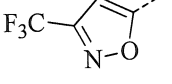
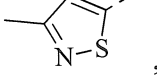
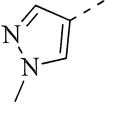
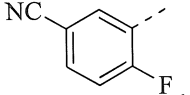
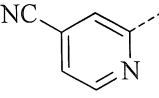
Theo một số phương án của sáng chế, R_3 được chọn từ CN, halogen, $C(=O)NH_2$, hoặc được chọn từ nhóm gồm C_{1-3} alkyl và C_{1-3} heteroalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_0 .

Theo một số phương án của sáng chế, R_3 được chọn từ CN, F, Cl, Br, CH_3 , CH_3CH_2 , CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_3O hoặc $C(=O)NH_2$.

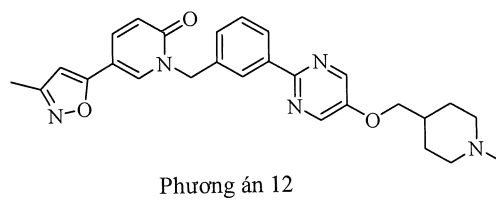
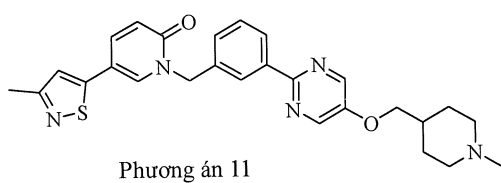
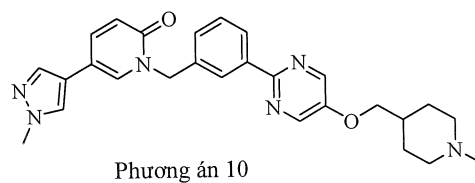
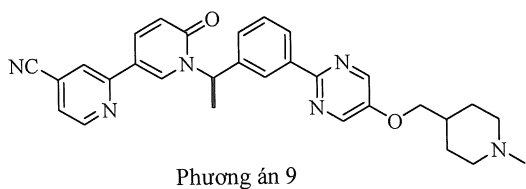
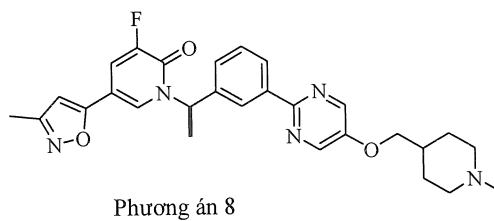
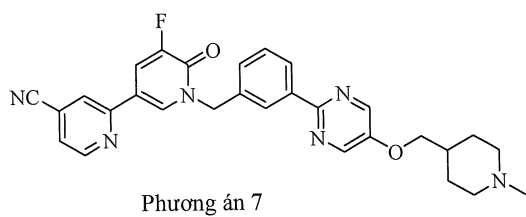
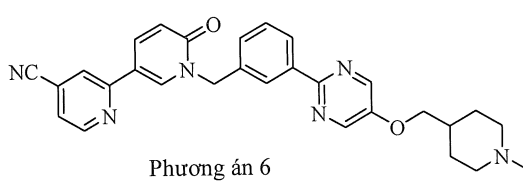
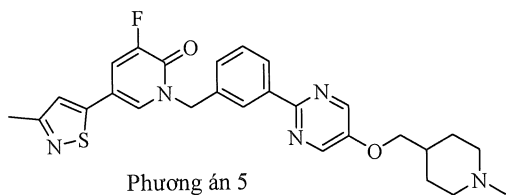
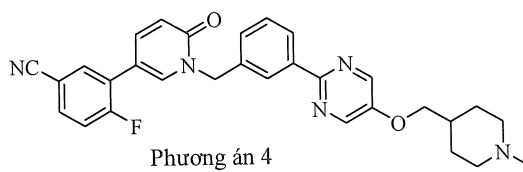
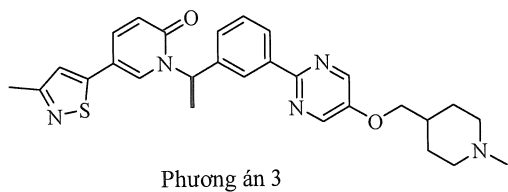
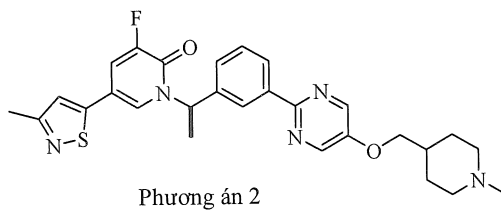
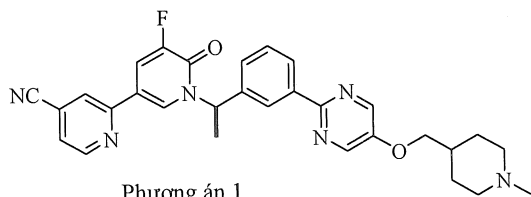
Theo một số phương án của sáng chế, A được chọn từ nhóm gồm , , , , và , mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R₃.

Theo một số phương án của sáng chế, A được chọn từ nhóm gồm , , , , , và .

Theo một số phương án của sáng chế, A được chọn từ nhóm gồm , , , , và .

Theo một số phương án của sáng chế, A được chọn từ nhóm gồm , , , , , , và , .

Theo một số phương án của sáng chế, hợp chất trên đây được chọn từ nhóm gồm



Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất được mô tả trên đây hoặc muối dược dụng của nó, cũng như chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất sử dụng hợp chất hoặc muối dược dụng của nó hoặc dược phẩm được mô tả trên đây để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh ung thư.

Hiệu quả kỹ thuật

Sáng chế tập trung vào việc cải biến chính xác cấu trúc của vị trí chuyển hóa, sao cho tính ổn định chuyển hóa của hợp chất nhắm đích được cải thiện ở mức cao. Ngoài ra, cấu trúc lõi pyridon hoàn toàn mới được thiết kế và tổng hợp nhằm làm cho lực liên kết giữa hợp chất nhắm đích và enzym C-Met được tăng cường đáng kể, do đó thu được hoạt tính ức chế cao hơn đối với sự tăng sinh của khối u. Trong khi đó, kết quả được lực học in vivo cho thấy rằng tốc độ tăng sinh khối u ở chuột nhắt dùng hợp chất theo sáng chế là thấp hơn đáng kể so với Tepotinib (EMD1214063) ở cùng liều, còn chứng minh rằng hợp chất theo sáng chế có hoạt tính ức chế u tốt hơn. Hợp chất theo sáng chế có thời gian bán hủy dài hơn, thời gian tác dụng trên đích kéo dài, độ ổn định chuyển hóa cao hơn và hoạt tính ức chế ưu việt hơn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ và cụm từ sau được sử dụng trong bản mô tả này được dự tính có nghĩa như sau. Thuật ngữ hoặc cụm từ cụ thể không được coi là không giới hạn hoặc không rõ ràng trong trường hợp thiếu định nghĩa cụ thể, mà cần được hiểu theo nghĩa thông thường. Khi tên thương mại xuất hiện trong bản mô tả này, nó được dùng để chỉ hàng hóa tương ứng hoặc thành phần hoạt tính của nó.

Thuật ngữ "dược dụng" được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến các hợp chất, vật liệu, chế phẩm, và/hoặc dạng liều, mà thích hợp để sử dụng tiếp xúc với mô người và động vật trong phạm vi đánh giá y khoa tốt, mà không gây độc, kích ứng, đáp ứng dị ứng quá mức, hoặc vấn đề hoặc biến chứng khác, tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý.

Thuật ngữ "muối dược dụng" chỉ muối của hợp chất theo sáng chế được điều chế bằng cách cho hợp chất có phân tử thể cụ thể theo sáng chế phản ứng với axit hoặc bazơ tương đối không độc. Khi hợp chất theo sáng chế chứa nhóm chức tương đối axit, muối cộng bazơ có thể được thu bằng cách cho dạng trung tính của hợp chất tiếp xúc với lượng đủ của bazơ trong dung dịch tinh khiết hoặc dung môi trơ thích hợp. Muối cộng bazơ dược dụng bao gồm muối của natri, kali, canxi, amoni, amin hữu cơ hoặc magie hoặc các muối tương tự. Khi hợp chất theo sáng chế chứa nhóm chức tương đối bazơ,

muối cộng axit có thể được thu bằng cách cho dạng trung tính của hợp chất tiếp xúc với lượng đủ của axit trong dung dịch tinh khiết hoặc dung môi trơ thích hợp. Ví dụ về muối cộng axit được dụng bao gồm muối axit vô cơ, trong đó axit vô cơ bao gồm, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit nitric, axit cacbonic, bicacbonat, axit phosphoric, monohydro phosphat, dihydro phosphat, axit sulfuric, hydro sulfat, axit hydroiodic, axit phosphorơ, và dạng tương tự; và muối axit hữu cơ, trong đó axit hữu cơ bao gồm, ví dụ, axit axetic, axit propionic, axit isobutyric, axit maleic, axit malonic, axit benzoic, axit succinic, axit suberic, axit fumaric, axit lactic, axit mandelic, axit phtalic, axit benzensulfonic, axit *p*-toluensulfonic, axit xitric, axit tartaric, và axit metansulfonic, và dạng tương tự; và muối của axit amin (như arginin và dạng tương tự), và muối của axit hữu cơ như axit glucuronic và dạng tương tự (tham khảo *Berge et al.*, "*Pharmaceutical Salts*", *Journal of Pharmaceutical Science* 66: 1-19 (1977)). Các hợp chất cụ thể nhất định theo sáng chế chứa cả nhóm chức bazơ và nhóm chức axit và có thể được chuyển hóa thành muối cộng bazơ hoặc axit bất kỳ.

Tốt hơn là, bằng cách cho muối này tiếp xúc với bazơ hoặc axit theo cách thông thường, tiếp theo tách hợp chất gốc, nhờ đó dạng trung tính của hợp chất được tái sinh. Sự khác nhau giữa dạng gốc của hợp chất và các dạng muối của nó nằm ở các đặc tính vật lý cụ thể, như độ tan khác nhau trong dung môi phân cực.

"Muối được dụng" được sử dụng trong bản mô tả này thuộc dẫn xuất của hợp chất theo sáng chế, trong đó, hợp chất gốc được biến đổi bằng cách tạo muối với axit hoặc bazơ. Ví dụ về muối được dụng bao gồm nhưng không giới hạn ở muối axit vô cơ hoặc axit hữu cơ của gốc bazơ như amin, muối kim loại kiềm hoặc muối hữu cơ của gốc axit như axit carboxylic, và dạng tương tự. Muối được dụng bao gồm muối không độc thông thường hoặc muối amoni bậc bốn của hợp chất gốc, như muối được tạo ra bởi axit vô cơ hoặc axit hữu cơ không độc. Muối không độc thông thường bao gồm nhưng không giới hạn ở muối có nguồn gốc từ axit vô cơ và axit hữu cơ, trong đó axit vô cơ hoặc axit hữu cơ được chọn từ nhóm gồm axit 2-axetoxibenzoic, axit 2-hydroxyetansulfonic, axit axetic, axit ascorbic, axit benzensulfonic, axit benzoic, bicacbonat, axit cacbonic, axit xitric, axit edetic, axit etandsulfonic, axit etansulfonic, axit fumaric, glucoheptosa, axit gluconic, axit glutamic, axit glycolic, axit bromhydric, axit clohydric, hydroiodua,

hydroxyl, hydroxynaphtalen, axit isethionic, axit lactic, lactoza, axit dodexyl sulfonic, axit maleic, axit malic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit nitric, axit oxalic, axit pamoic, axit pantothenic, axit phenylaxetic, axit phosphoric, axit polygalactanal, axit propionic, axit salixylic, axit stearic, axit subaxetic, axit succinic, axit sulfamic, axit sulfanilic, axit sulfuric, tanin, axit tartaric và axit *p*-toluensulfonic.

Muối được dùng theo sáng chế có thể được điều chế từ hợp chất gốc chứa gốc axit hoặc bazơ bằng các phương pháp hóa học thông thường. Nói chung, muối như vậy có thể được điều chế bằng cách cho dạng axit hoặc bazơ tự do của hợp chất phản ứng với tỷ lượng axit hoặc bazơ thích hợp trong nước hoặc dung môi hữu cơ hoặc hỗn hợp của chúng. Nói chung, môi trường không phải nước như ete, etyl axetat, etanol, isopropanol hoặc axetonitril được ưu tiên.

Ngoài dạng muối, hợp chất theo sáng chế còn tồn tại ở dạng tiền dược chất. Tiền dược chất của hợp chất được mô tả trong bản mô tả này là hợp chất dễ dàng trải qua quá trình biến đổi hóa học trong điều kiện sinh lý để được chuyển hóa thành hợp chất theo sáng chế. Ngoài ra, tiền dược chất có thể được chuyển hóa thành hợp chất theo sáng chế bằng phương pháp hóa học hoặc sinh hóa trong môi trường *in vivo*.

Một số hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng không solvat hoặc dạng solvat, bao gồm dạng hydrat. Nói chung, dạng solvat là tương đương với dạng không solvat, và cả hai dạng này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Một số hợp chất theo sáng chế có thể có nguyên tử cacbon không đối xứng (tâm quang) hoặc liên kết đôi. Raxemat, chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân hình học và chất đồng phân riêng đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trừ khi có quy định khác, liên kết hình nêm và liên kết đứt nét ( ) được dùng để chỉ cấu hình tuyệt đối của tâm lập thể,  và  được dùng để chỉ cấu hình tương đối của tâm lập thể. Khi hợp chất được mô tả trong bản mô tả này chứa liên kết đôi olefin hoặc tâm không đối xứng hình học khác, các chất đồng phân hình học *E* và *Z* được bao gồm trừ khi có quy định khác. Tương tự, tất cả các dạng tautome đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hợp chất theo sáng chế có thể có mặt ở dạng chất đồng phân lập thể hoặc hình học riêng. Sáng chế bao hàm tất cả các hợp chất như vậy, bao gồm chất đồng phân *cis* và *trans*, chất đồng phân đối ảnh (-) và (+), chất đồng phân đối ảnh (*R*) và (*S*), chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân (*D*), chất đồng phân (*L*), và hỗn hợp racemic và các hỗn hợp khác, ví dụ, hỗn hợp giàu chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang, đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Phân tử thể như alkyl có thể có nguyên tử cacbon không đối xứng bổ sung. Tất cả các chất đồng phân này và các hỗn hợp của chúng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Chất đồng phân quang hoạt (*R*) và (*S*), hoặc chất đồng phân *D* và *L* có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp không đối xứng hoặc các chất phản ứng không đối xứng hoặc các kỹ thuật thông thường khác. Nếu cần thu một loại chất đồng phân đối ảnh của hợp chất nhất định theo sáng chế, thì chất đồng phân đối ảnh mong muốn tinh khiết có thể được thu bằng cách tổng hợp không đối xứng hoặc tạo dẫn xuất bằng nhóm phụ trợ không đối xứng tiếp theo là tách hỗn hợp đồng phân không đối quang thu được và cắt nhóm phụ trợ. Theo cách khác, khi phân tử chứa nhóm chức bazơ (như amino) hoặc nhóm chức axit (như carboxyl), hợp chất phản ứng với axit hoặc bazơ quang hoạt thích hợp để tạo ra muối của chất đồng phân không đối quang mà tiếp theo được tách đồng phân không đối quang bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này thu được chất đồng phân đối ảnh tinh khiết. Ngoài ra, chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang thường được tách bằng phương pháp sắc ký sử dụng pha tĩnh không đối xứng và tùy ý kết hợp với phương pháp dẫn xuất hóa học (ví dụ, carbamat được tạo ra từ amin).

Hợp chất theo sáng chế có thể chứa đồng vị nguyên tử có tỷ lệ không tự nhiên tại một hoặc nhiều nguyên tử cấu thành hợp chất. Ví dụ, hợp chất có thể được đánh dấu phóng xạ bằng đồng vị phóng xạ, như triti (^3H), iot-125 (^{125}I) hoặc C-14 (^{14}C). Tất cả các dạng đồng vị khác nhau của hợp chất theo sáng chế, bất kể có hoạt tính phóng xạ hay không, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" chỉ tác nhân hoặc môi trường mang bất kỳ có khả năng phân phối lượng hữu hiệu của hoạt chất theo sáng chế, không ngăn cản hoạt tính sinh học của hoạt chất và không gây ra tác dụng phụ độc hại cho vật chủ hoặc bệnh

nhân. Chất mang tiêu biểu bao gồm nước, dầu, thực vật và khoáng chất, chất nền kem, chất nền thuốc rửa, chất nền thuốc mỡ và dạng tương tự. Chất nền bao gồm chất tạo huyền phù, chất làm đặc, chất tăng cường tính thấm và dạng tương tự. Việc điều chế chúng là đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực mỹ phẩm hoặc lĩnh vực dược phẩm dùng khu trú. Thông tin thêm về chất mang có thể được đề cập trong *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed, Lippincott, Williams & Wilkins (2005)*, phần bố cục của nó được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Đối với dược phẩm hoặc hoạt chất dược, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu điều trị" chỉ lượng không độc nhưng đủ để đạt được tác dụng mong muốn của dược phẩm hoặc hoạt chất. Đối với dạng liều dùng qua đường miệng theo sáng chế, "lượng hữu hiệu" của hoạt chất trong dược phẩm chỉ lượng cần để đạt được tác dụng mong muốn khi kết hợp với hoạt chất khác trong dược phẩm. Lượng hữu hiệu khác nhau giữa các đối tượng và được xác định tùy theo độ tuổi và tình trạng chung của đối tượng nhận cũng như hoạt chất cụ thể. Lượng hữu hiệu thích hợp trong trường hợp cụ thể có thể được xác định bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này dựa trên thí nghiệm thông thường.

Thuật ngữ "thành phần hoạt tính", "chất điều trị", "hoạt chất" hoặc "chất hoạt tính" chỉ hóa chất có thể điều trị hữu hiệu rối loạn, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý đích.

"Tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc tình trạng tiếp theo có thể xảy ra mà không nhất thiết, thuật ngữ này bao gồm trường hợp sự kiện hoặc tình trạng xảy ra và trường hợp trong đó sự kiện hoặc tình trạng không xảy ra.

Thuật ngữ "được thế" có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một nguyên tử hydro trên nguyên tử cụ thể được thế bằng phân tử thế, bao gồm đơteri và các biến thể hydro, miễn là hóa trị của nguyên tử cụ thể là bình thường và hợp chất được thế là ổn định. Khi phân tử thế là nhóm keto (tức là $=O$), nó có nghĩa hai nguyên tử hydro được thế. Các vị trí trên vòng thơm không thể được thế bằng nhóm keto. Thuật ngữ "tùy ý được thế" có nghĩa nguyên tử có thể được thế bằng phân tử thế hoặc không, trừ khi có quy định khác, loại và số lượng phân tử thế có thể tùy ý miễn là có thể thực hiện được về mặt hóa học.

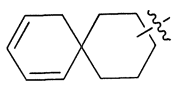
Khi biến bất kỳ (như R) xảy ra nhiều hơn một lần trong cấu tạo hoặc cấu trúc của

hợp chất, định nghĩa về biến mỗi khi có mặt là độc lập. Do đó, ví dụ, nếu một nhóm được thế bằng 0-2 R, nhóm này có thể tùy ý được thế bằng đến hai R, trong đó định nghĩa về R mỗi khi có mặt là độc lập. Hơn nữa, tổ hợp của phần tử thế và/hoặc biến thế của nó chỉ được phép khi tổ hợp này tạo ra hợp chất ổn định.

Khi liên kết của phần tử thế có thể liên kết ngang với hai nguyên tử trên vòng, phần tử thế như vậy có thể được liên kết với nguyên tử bất kỳ trên vòng. Khi phần tử thế liệt kê không chỉ ra nguyên tử mà nhờ đó nó được gắn với hợp chất được bao gồm trong công thức hóa học chung mà không nêu rõ, phần tử thế như vậy có thể được liên kết bởi nguyên tử bất kỳ của nó. Sự kết hợp các phần tử thế và/hoặc các biến thế của chúng chỉ được phép khi sự kết hợp như vậy có thể tạo ra hợp chất ổn định. Ví dụ, đơn vị cấu trúc



hoặc



có nghĩa là nó có thể được thế ở vị trí bất kỳ trên xyclohexyl hoặc xyclohexadien.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "hetero" thể hiện nguyên tử khác loại hoặc nhóm nguyên tử khác loại (ví dụ, nhóm nguyên tử chứa nguyên tử khác loại), bao gồm nguyên tử ngoại trừ cacbon (C) và hydro (H) và nhóm nguyên tử chứa nguyên tử khác loại trên đây, ví dụ, bao gồm oxy (O), nitơ (N), lưu huỳnh (S), silicon (Si), germani (Ge), nhôm (Al), bo (B), -O-, -S-, =O, =S, -C(=O)O-, -C(=O)-, -C(=S)-, -S(=O), -S(=O)₂-, và nhóm gồm -C(=O)N(H)-, -N(H)-, -C(=NH)-, -S(=O)₂N(H)- và -S(=O)N(H)-, mỗi phần tử này là tùy ý được thế.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "heterohydrocarbyl" hoặc dạng cụ thể của nó (như heteroalkyl, heteroalkenyl, heteroalkynyl, và heteroaryl, v.v.), chính nó hoặc dưới dạng một phần của phần tử thế khác, chỉ nhóm hydrocacbon mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng ổn định hoặc hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, có số lượng nguyên tử cacbon cụ thể và ít nhất một nguyên tử khác loại. Theo một số phương án, thuật ngữ "heteroalkyl" chính nó hoặc kết hợp với thuật ngữ khác chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng, mạch nhánh ổn định hoặc tổ hợp của chúng có số lượng nguyên tử cacbon cụ thể và ít nhất một nguyên tử khác loại. Theo phương án cụ thể, nguyên tử khác loại được chọn từ B, O, N và S, trong đó các nguyên tử nitơ và lưu huỳnh là tùy ý được oxy hóa và nguyên tử nitơ là tùy ý được thế bậc bốn. Nguyên tử khác loại hoặc nhóm nguyên tử

khác loại có thể nằm ở vị trí bên trong bất kỳ của heterohydrocarbyl, bao gồm vị trí tại đó hydrocarbyl gắn với phần còn lại của phân tử. Song các thuật ngữ "alkoxy", "alkylamino" và "alkylthio" (hoặc thioalkyl) được sử dụng theo nghĩa thông thường và chỉ nhóm alkyl nối với phần còn lại của phân tử lần lượt nhờ nguyên tử oxy, amino hoặc nguyên tử lưu huỳnh. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ và $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Đến hai nguyên tử khác loại liên kề có thể có mặt, như, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "alkyl" chỉ nhóm hydrocacbon no mạch thẳng hoặc mạch nhánh, có thể được thế một lần (ví dụ, $-\text{CH}_2\text{F}$) hoặc được thế nhiều lần (ví dụ, $-\text{CF}_3$), có thể có hóa trị một (ví dụ, metyl), hóa trị hai (ví dụ, metylen) hoặc đa trị (ví dụ, metenyl). Ví dụ về alkyl bao gồm metyl (Me), etyl (Et), propyl (như n-propyl và isopropyl), butyl (như n-butyl, isobutyl, s-butyl, t-butyl), pentyl (như n-pentyl, isopentyl, neopentyl) và dạng tương tự.

Trừ khi có quy định khác, xycloalkyl bao gồm hydrocarbyl một vòng hoặc nhiều vòng ổn định bất kỳ, và nguyên tử cacbon bất kỳ là no, có thể được thế một lần hoặc nhiều lần, và có thể có hóa trị một, hóa trị hai hoặc đa trị. Ví dụ về xycloalkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xyclopropyl, norbornanyl, [2.2.2]bixyclooctan, [4.4.0]bixyclodecanyl và dạng tương tự.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "halo" hoặc "halogen" chính nó hoặc dưới dạng một phần của phân tử thế khác chỉ nguyên tử flo, clo, brom hoặc iot. Hơn thế nữa, thuật ngữ "haloalkyl" có nghĩa là bao gồm monohaloalkyl và polyhaloalkyl. Ví dụ, thuật ngữ "halo(C1-C4)alkyl" có nghĩa là bao gồm, nhưng không giới hạn ở, triflometyl, 2,2,2-trifloetyl, 4-clobutyl, 3-bromopropyl và dạng tương tự. Ví dụ về haloalkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở triflometyl, triclometyl, pentafoetyl và pentacloetyl.

Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp tổng hợp đã biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm phương án liệt kê sau, phương án được tạo ra bằng phương án liệt kê sau kết hợp với các phương pháp tổng hợp hóa học khác và phương pháp thay thế tương đương đã biết rõ đối với người

có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Phương án ưu tiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở phương án theo sáng chế.

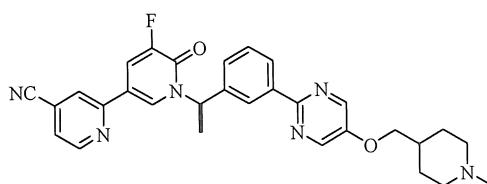
Tất cả các dung môi được sử dụng trong sáng chế là có bán trên thị trường. Sáng chế sử dụng các chữ viết tắt sau: aq chỉ nước; HATU chỉ O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluron hexaflorophosphat; EDC chỉ N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochlorua; m-CPBA chỉ 3-cloperoxyaxit benzoic; eq chỉ đương lượng; CDI chỉ carbonyl diimidazol; DCM chỉ diclometan; PE chỉ ete dầu hỏa; DIAD chỉ diisopropyl azodicarboxylat; DMF chỉ N,N-dimetylformamit; DMSO chỉ dimetyl sulfoxit; EtOAc chỉ etyl axetat; EtOH chỉ etanol; MeOH chỉ metanol; CBz chỉ benzyloxycarbonyl, là nhóm bảo vệ amino; BOC chỉ tert-butylcarbonyl, là nhóm bảo vệ amino; HOAc chỉ axit axetic; NaCNBH₃ chỉ natri xyanobohydrua; rt chỉ nhiệt độ trong phòng; O/N chỉ qua đêm; THF chỉ tetrahydrofuran; Boc₂O chỉ di-tert-butylidicacbonat; TFA chỉ axit trifloaxetic; DIPEA chỉ diisopropyletylamin; SOCl₂ chỉ thionyl clorua; CS₂ chỉ cacbon disulfua; TsOH chỉ axit p-toluensulfonic; NFSI chỉ N-fluoro-N-(benzensulfonyl) benzensulfonamit; NCS chỉ N-closucxinimit; n-Bu₄NF chỉ tetrabutylamoni florua; iPrOH chỉ 2-propanol; mp chỉ điểm nóng chảy; LDA chỉ lithi diisopropylamit.

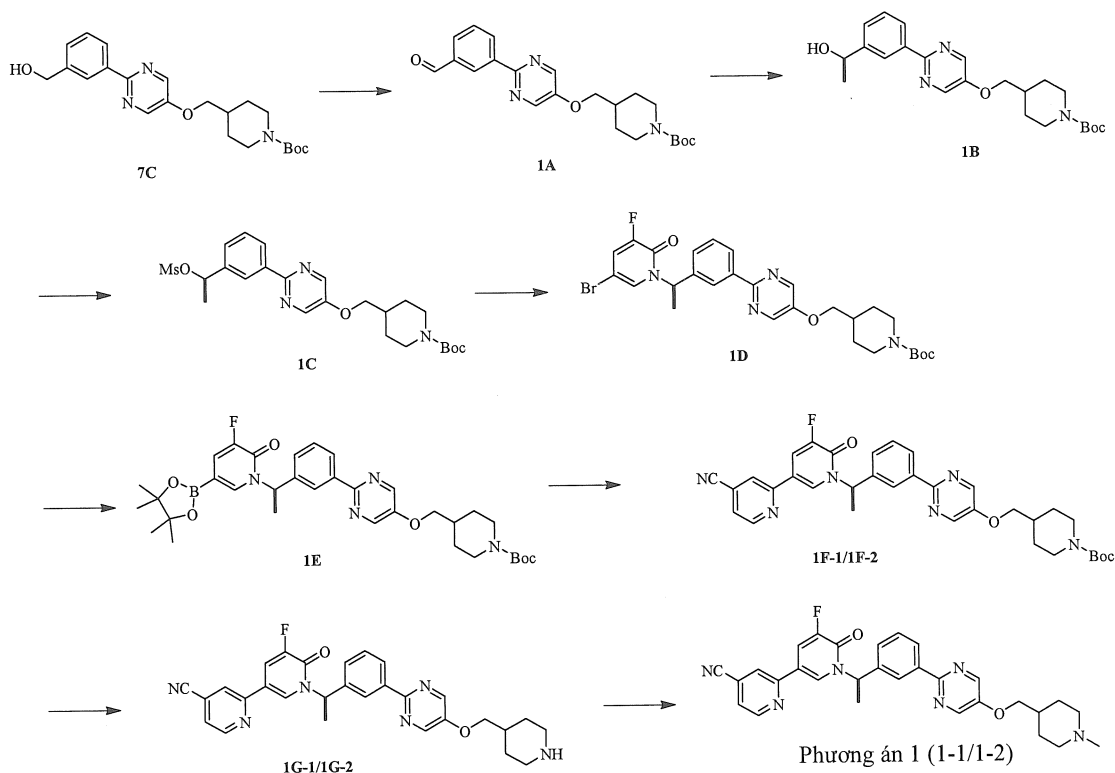
Các hợp chất được đặt tên một cách thủ công hoặc bằng phần mềm ChemDraw®, các hợp chất có bán trên thị trường sử dụng tên thư mục của nhà cung cấp.

Mô tả chi tiết các phương án ưu tiên

Các phương án sau minh họa thêm sáng chế, song sáng chế không bị giới hạn ở đó. Trong khi sáng chế được mô tả chi tiết và tham chiếu đến các phương án cụ thể của nó, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các thay đổi và cải biến có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Phương án 1 (1-1 và 1-2)





Bước A:

Dung dịch chứa hợp chất trung gian 7C (phương pháp tổng hợp xem phương án 7) (20,4 g, 50,88 mmol) và mangan dioxit (44,23 g, 508,7 mmol) trong DCM (300 mL) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 1A (18,4 g) được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo. LCMS (ESI) m/z : 398(M+1).

Bước B:

Metylmagie bromua (3 M, 38,58 mL) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 1A (23,0 g, 57,87 mmol) trong THF (200 mL) ở 0°C. Dung dịch được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau phản ứng kết thúc, hỗn hợp được dập tắt bằng dung dịch natri clorua bão hòa (300 mL), được chiết bằng etyl axetat (200 mL*2), được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 1B (22,76 g, hiệu suất 95,11%). LCMS (ESI) m/z : 414(M+1). HNMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ = 8,46 (s, H), 8,38-8,33 (m, 1H), 8,26 (td, $J=1,9,6,9$ Hz, 1H), 7,53 - 7,44 (m, 2H), 5,02 (q, $J=6,4$ Hz, 1H), 4,31 - 4,12 (m, 2H), 3,95 (d, $J=6,4$ Hz, 2H), 2,78 (br t, $J=12,1$ Hz, 2H), 2,13 (br s, 1H), 2,08 - 1,96 (m, 1H), 1,86 (br d, $J=12,9$ Hz, 2H), 1,58 (d, $J=6,5$ Hz, 3H), 1,49 (s, 9H), 1,39 - 1,29 (m, 2H).

Bước C:

Diisopropyletylamin (21,34 g, 165,12 mmol) và metansulfonyl clorua (9,12 g, 79,62 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 1B (22,7 g, 55,04 mmol) trong DCM (300 mL) ở 0°C. Dung dịch phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc như được theo dõi bằng TLC, hỗn hợp được rửa bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (200 mL) hai lần, được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 1C (30 g, sản phẩm thô) được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo.

Bước D:

Kali cacbonat (10,68 g, 77,30 mmol), kali iodua (641,58 mg, 3,86 mmol) và 5-bromo-3-flo-1H-pyridin-2-on (11,13 g, 57,97 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 1C (19 g, 3,86 mmol) trong DMF (100 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 90°C trong 3 giờ. Sau phản ứng kết thúc, ethyl axetat (300 mL) được bổ sung vào dung dịch và dung dịch thu được được rửa bằng nước muối (300 mL) ba lần. Pha hữu cơ được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 1D (5,8 g, hiệu suất 25,54%). HNMR (400MHz, CLOROFOM-d) δ = 8,47 (s, 2H), 8,41 - 8,32 (m, 2H), 7,55 - 7,47 (m, 1H), 7,39 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,15 (dd, J=2,4, 8,4 Hz, 1H), 7,11 - 7,07 (m, 1H), 6,52 (q, J=7,0 Hz, 1H), 4,31 - 4,12 (m, 2H), 4,01 - 3,93 (m, 2H), 2,87 - 2,72 (m, 2H), 2,09 - 1,98 (m, 1H), 1,89 - 1,80 (m, 5H), 1,49 (s, 9H), 1,39 - 1,30 (m, 2H).

Bước E:

Trong môi trường khí nitơ, hợp chất trung gian 1D (2,0 g, 3,4 mmol), 4,4,5,5-tetrametyl-2-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1,3,2-dioxaborolan (1,04 g, 4,09 mmol), axetat kali (668,21 mg, 6,81 mmol) và Pd(dppf)Cl₂ (498,20 mg, 680,87 μ mol) được hòa tan trong dioxan (30 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 90°C trong 2 giờ. Sau phản ứng kết thúc, dung dịch (30 mL) chứa hợp chất trung gian 1E trong dioxan được thu và được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo.

Bước F (1F-1, 1F-2):

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch (30 mL) chứa hợp chất trung gian 1E (1,92 g, 3,03 mmol) trong dioxan, natri cacbonat (642,30 mg, 6,06 mmol), 2-bromo-5-xyanopyridin (665,42 mg, 3,64 mmol) và Pd(dppf)Cl₂ (443,43 mg, 606,0 μmol) được hòa tan trong dioxan (40 mL) và nước (6 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được khuấy ở 90°C trong 3 giờ. Sau phản ứng kết thúc, hỗn hợp được lọc và nước (100 mL) được bổ sung vào phần lọc và được chiết bằng etyl axetat (60 mL*3). Pha hữu cơ được sấy khô trên natri sulfat khan và tiếp theo được lọc và cô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng tấm điều chế, và hợp chất trung gian 1F-1 (t=2,819, 490 mg, hiệu suất 26,04%) và hợp chất trung gian 1F-2 (t=3,933, 480 mg, hiệu suất 25,95%) được tách bằng SFC (loại cột: AS (250 mm*30 mm, 10 μm); pha động: [B: 0,1% NH₃H₂O EtOH]; B%: 55%-55%, 10 phút; 200 minmin).

LCMS (ESI) m/z: 611 (M+1).

¹H NMR (hợp chất trung gian 1F-1) (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,73 (dd, J=0,9, 5,0 Hz, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,39 (s, 1H), 8,34 - 8,26 (m, 2H), 8,17 - 8,08 (m, 2H), 7,58 - 7,49 (m, 3H), 6,50 (q, J=7,2 Hz, 1H), 4,15 (br d, J=13,3 Hz, 2H), 4,06 (d, J=6,3 Hz, 2H), 2,84 (br s, 2H), 2,14 - 2,01 (m, 1H), 1,97 (d, J=7,3 Hz, 3H), 1,87 (br d, J=11,9 Hz, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,35 - 1,28 (m, 2H).

¹H NMR (hợp chất trung gian 1F-2) (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,73 (dd, J=0,8, 5,0 Hz, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,39 (s, 1H), 8,34 - 8,26 (m, 2H), 8,16 - 8,09 (m, 2H), 7,61 - 7,49 (m, 3H), 6,50 (q, J=7,2 Hz, 1H), 4,15 (br d, J=13,2 Hz, 2H), 4,06 (d, J=6,3 Hz, 2H), 2,84 (br s, 2H), 2,12 - 2,01 (m, 1H), 1,99 - 1,95 (m, 3H), 1,87 (br d, J=10,9 Hz, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,35 - 1,29 (m, 2H).

Bước G (1G-1, 1G-2)

Axit trifloaxetic (3 mL) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 1F-1 (490 mg, 786,01 μmol) trong DCM (10 mL) ở 0°C. Dung dịch phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau phản ứng kết thúc, hỗn hợp được làm bay hơi đến khô thu được hợp chất trung gian 1G-1 (502 mg, sản phẩm thô) được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo. Hợp chất trung gian 1G-2 (491 mg, sản phẩm thô) được thu

bằng phương pháp giống như hợp chất trung gian 1G-1.

Bước H:

Formalin (326,27 mg, 4,02 mmol, độ tinh khiết 37%) và natri triaxetoxibohydrua (511,03 mg, 2,41 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 1G-1 (502,00 mg, 803,74 mmol) trong DCM (10 mL) ở 0°C. Dung dịch phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau phản ứng kết thúc, hỗn hợp được dập tắt bằng nước (50 mL) và DCM (30 mL*2). Pha hữu cơ được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô. Sản phẩm thô thu được được tinh chế bằng HPLC điều chế thu được phương án 1-1 (150 mg, hiệu suất 35,41%).

Phương án 1-2 (100,6 mg, hiệu suất 23,91%) được thu bằng phương pháp giống như phương án 1-1, bắt đầu từ hợp chất trung gian 1G-2.

Phương án 1-1:

LCMS (ESI) m/z: 525 (M+1).

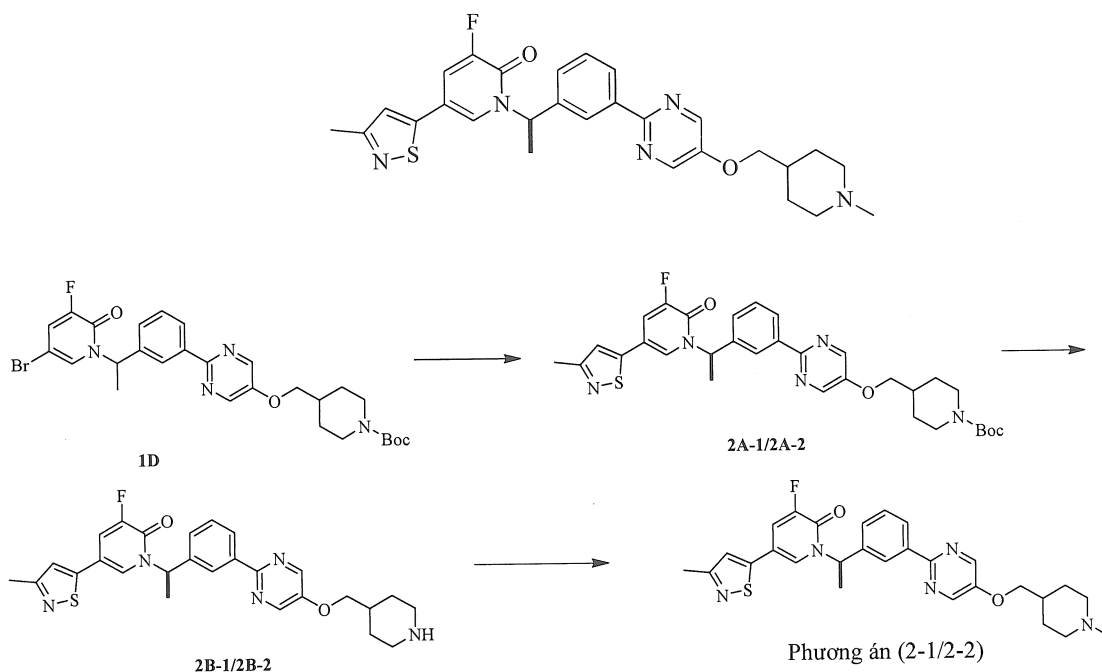
¹H NMR (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,73 (d, J=4,9 Hz, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,49 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,34 - 8,26 (m, 2H), 8,18 - 8,09 (m, 2H), 7,61 - 7,49 (m, 3H), 6,50 (q, J=7,2 Hz, 1H), 4,13 (d, J=5,8 Hz, 2H), 3,53 (br d, J=12,4 Hz, 2H), 3,03 (br t, J=12,4 Hz, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,27 - 2,08 (m, 3H), 1,97 (d, J=7,2 Hz, 3H), 1,81 - 1,63 (m, 2H).

Phương án 1-2:

LCMS (ESI) m/z: 525 (M+1).

¹H NMR (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,72 (dd, J=0,8, 5,0 Hz, 1H), 8,61 - 8,46 (m, 3H), 8,38 (s, 1H), 8,33 - 8,25 (m, 2H), 8,16 - 8,08 (m, 2H), 7,58 - 7,47 (m, 3H), 6,49 (q, J=7,1 Hz, 1H), 4,12 (d, J=5,9 Hz, 2H), 3,50 (br d, J=12,2 Hz, 2H), 3,05 - 2,93 (m, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,22 - 2,06 (m, 3H), 1,96 (d, J=7,2 Hz, 3H), 1,80 - 1,62 (m, 2H).

Phương án 2 (2-1 và 2-2)



Bước A:

Trong môi trường khí nitơ, hợp chất trung gian 1D (1,0 g*2, 1,70 mmol), 3-metyl-5-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)isothiazol (1,15 g, 5,10 mmol), kali phosphat (1 M, 3,4 mL) và 1,1-(tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (110,80 mg, 170,00 μ mol) được hòa tan trong THF (10 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 70°C trong 16 giờ. Dung dịch phản ứng tiếp theo được lọc và nước (50 mL) được bổ sung vào. Hỗn hợp được chiết bằng etyl axetat (30 mL*3). Pha hữu cơ tiếp theo được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô. Sản phẩm thô tiếp theo được tinh chế bằng HPLC điều chế. Hợp chất trung gian 2A-1 (t_r =2,529, 560 mg, hiệu suất 24,28%) và hợp chất trung gian 2A-2 (t_r =3,494, 500 mg, hiệu suất 27,19%) được tách bằng SFC (loại cột: AS (250 mm*30 mm, 10 μ m); pha động: [B: 0,1% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ EtOH]; B%: 35%-35%, 7,2 phút; 200 minmin).

LCMS (ESI) m/z : 605 ($M+1$)

^1H NMR (hợp chất trung gian 2A-1) (400MHz, METANOL- d_4) δ = 8,61 - 8,50 (m, 2H), 8,41 - 8,26 (m, 2H), 7,76 (d, J =2,1 Hz, 1H), 7,70 (dd, J =2,1, 10,0 Hz, 1H), 7,57 - 7,50 (m, 2H), 7,29 (s, 1H), 6,45 (q, J =7,1 Hz, 1H), 4,16 (br d, J =13,3 Hz, 2H), 4,07 (d, J =6,1 Hz, 2H), 2,85 (br s, 2H), 2,45 (s, 3H), 2,08 (br s, 1H), 1,96 - 1,84 (m, 5H),

1,48 (s, 9H), 1,37 - 1,29 (m, 2H).

¹H NMR (hợp chất trung gian 2A-2) (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,59 - 8,53 (m, 2H), 8,41 - 8,27 (m, 2H), 7,76 (s, 1H), 7,73 - 7,66 (m, 1H), 7,58 - 7,49 (m, 2H), 7,28 (d, J=2,8 Hz, 1H), 6,45 (q, J=6,9 Hz, 1H), 4,16 (br d, J=13,6 Hz, 2H), 4,06 (dd, J=3,9, 6,1 Hz, 2H), 2,94 - 2,78 (m, 2H), 2,44 (d, J=2,1 Hz, 3H), 2,07 (td, J=3,7, 9,6 Hz, 1H), 1,96 - 1,84 (m, 5H), 1,48 (s, 9H), 1,36 - 1,27 (m, 2H).

Bước B: hợp chất trung gian 2B-1 và hợp chất trung gian 2B-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G-1.

Bước C: phương án 2-1 và 2-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế theo phương án 1.

Phương án 2-1:

LCMS (ESI) m/z: 520 (M+1).

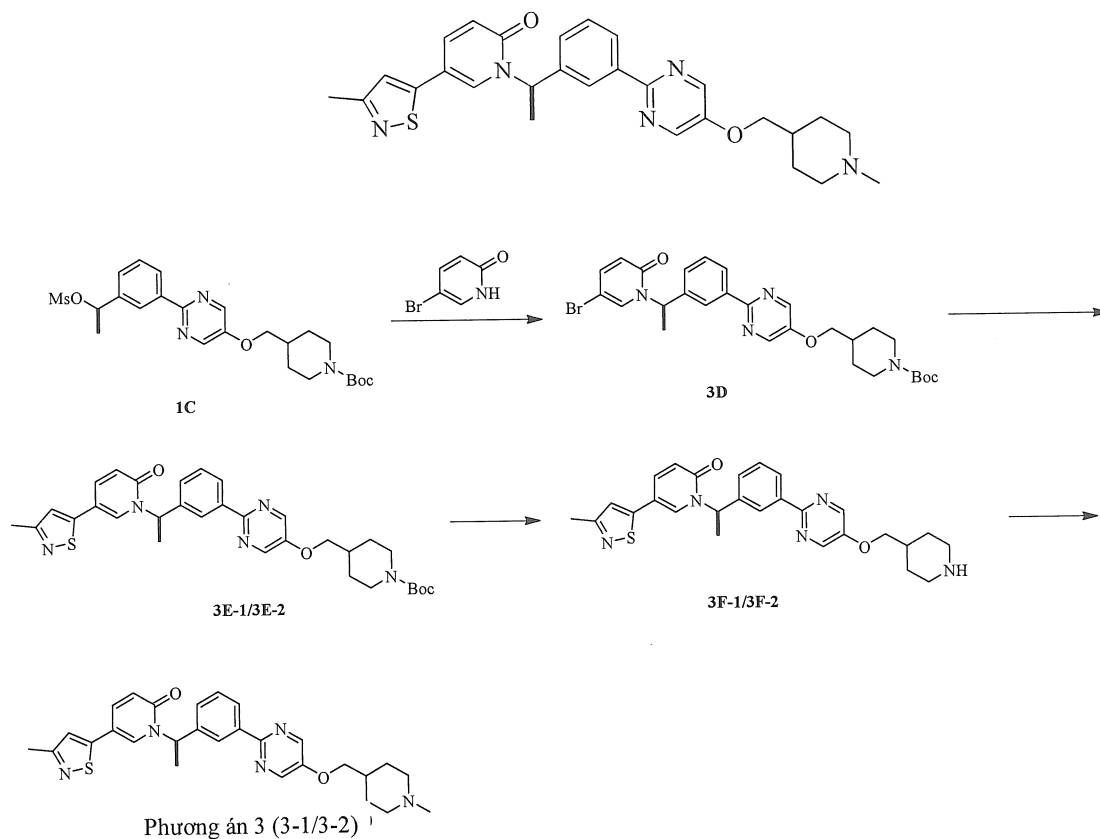
¹H NMR (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,73 (s, 2H), 8,35 (s, 1H), 8,29 (d, J=7,2 Hz, 1H), 7,86 - 7,81 (m, 1H), 7,72 (dd, J=2,3, 10,0 Hz, 1H), 7,64 - 7,58 (m, 2H), 7,36 (s, 1H), 6,45 (q, J=7,1 Hz, 1H), 4,21 (d, J=5,9 Hz, 2H), 3,63 (br d, J=12,4 Hz, 2H), 3,15 (br t, J=11,9 Hz, 2H), 2,92 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,33 - 2,06 (m, 3H), 1,99 (d, J=7,2 Hz, 3H), 1,86 - 1,73 (m, 2H).

Phương án 2-2:

LCMS (ESI) m/z: 520 (M+1).

¹H NMR (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,75 (s, 2H), 8,37 (s, 1H), 8,28 (d, J=7,2 Hz, 1H), 7,88 - 7,81 (m, 1H), 7,70 (dd, J=2,3, 10,0 Hz, 1H), 7,65 - 7,56 (m, 2H), 7,34 (s, 1H), 6,42 (q, J=7,1 Hz, 1H), 4,20 (d, J=5,9 Hz, 2H), 3,62 (br d, J=12,4 Hz, 2H), 3,12 (br t, J=11,9 Hz, 2H), 2,91 (s, 3H), 2,45 (s, 3H), 2,33 - 2,08 (m, 3H), 1,96 (d, J=7,2 Hz, 3H), 1,87 - 1,70 (m, 2H).

Phương án 3

**Bước A:**

Hợp chất trung gian 3D được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1D.

Bước B:

Hợp chất trung gian 3E được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1F. Hợp chất trung gian 3E-1 ($t_r=2,805$, 33 mg, hiệu suất 33,0%) và hợp chất trung gian 3E-2 ($t_r=3,255$, 33 mg, hiệu suất 33%) được tách bằng SFC (loại cột: AS (250 mm*30 mm, 10 μm); pha động: [B: 0,1% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ EtOH]; B%: 40%-40%, 5 phút; 80 min/min). LCMS (ESI) m/z : 588 ($M+1$).

Bước C:

Hợp chất trung gian 3F-1 (580 mg, sản phẩm thô) và 3F-2 (520 mg, sản phẩm thô) được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G.

Bước D:

Phương án 3-1 và 3-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế theo phương án 1.

Phương án 3-1:

LCMS (ESI) m/z: 502 (M+1).

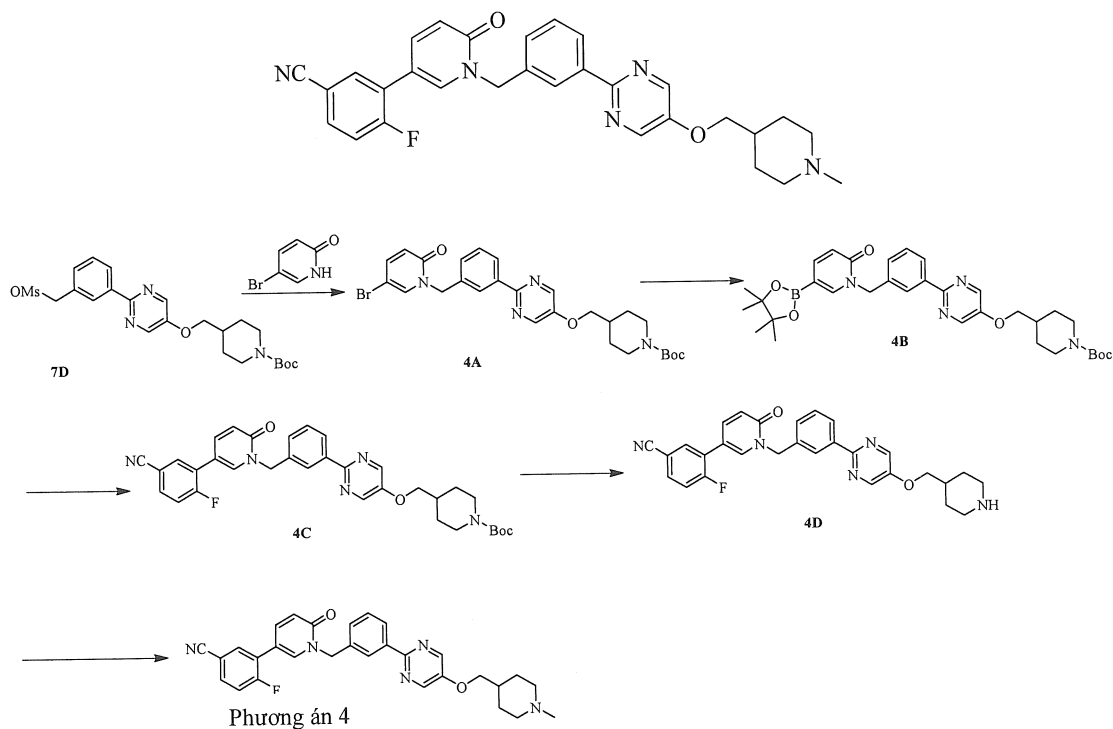
¹H NMR (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,62 - 8,49 (m, 3H), 8,36 (s, 1H), 8,31 (br d, J=6,8 Hz, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,77 (br d, J=9,4 Hz, 1H), 7,57 - 7,49 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 6,71 (d, J=9,4 Hz, 1H), 6,42 (q, J=6,6 Hz, 1H), 4,13 (br d, J=5,1 Hz, 2H), 3,50 (br d, J=11,9 Hz, 2H), 2,97 (br t, J=12,2 Hz, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,24 - 2,06 (m, 3H), 1,91 (br d, J=7,1 Hz, 3H), 1,80 - 1,61 (m, 2H).

Phương án 3-2:

LCMS (ESI) m/z: 502 (M+1).

¹H NMR (400MHz, METANOL-d₄) δ = 8,56 (s, 2H), 8,49 (br s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,30 (br d, J=6,7 Hz, 1H), 7,91 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,77 (dd, J=2,4, 9,4 Hz, 1H), 7,56 - 7,49 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 6,70 (d, J=9,4 Hz, 1H), 6,41 (q, J=7,1 Hz, 1H), 4,13 (d, J=5,7 Hz, 2H), 3,54 (br d, J=12,3 Hz, 2H), 3,05 (br t, J=11,9 Hz, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,21 - 2,08 (m, 3H), 1,91 (d, J=7,1 Hz, 3H), 1,79 - 1,67 (m, 2H).

Phương án 4



Bước A:

Hợp chất trung gian 4A được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1D.

Bước B:

Hợp chất trung gian 4B được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1E.

Bước C:

Hợp chất trung gian 4C được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1F.

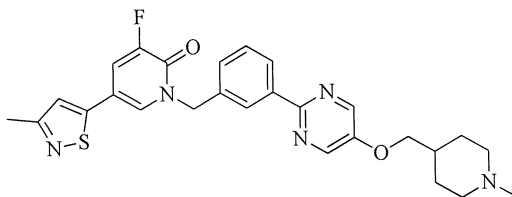
Bước D:

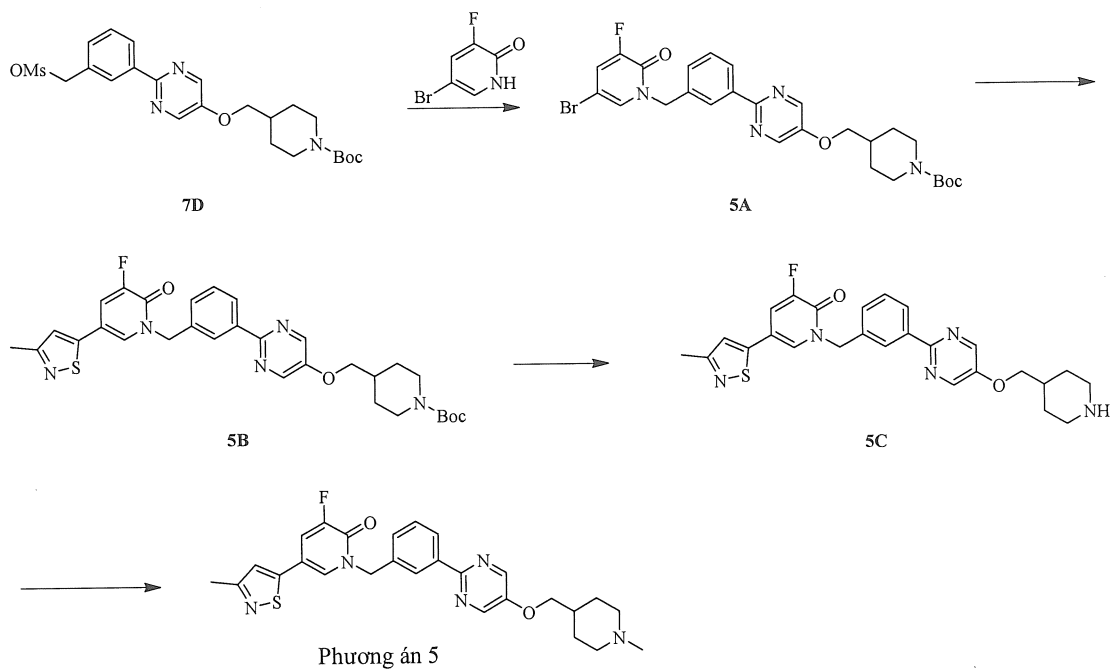
Hợp chất trung gian 4D được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G.

Bước E:

Phương án 4 được điều chế bằng phương pháp điều chế phương án 1. LCMS (ESI) m/z : 510 (M+1). HNMR (400MHz, METANOL- d_4) δ = 8,59 - 8,47 (m, 3H), 8,37 (s, 1H), 8,32 - 8,24 (m, 1H), 8,17 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 7,95 (dd, $J=2,0, 7,3$ Hz, 1H), 7,85 - 7,73 (m, 2H), 7,51 - 7,46 (m, 2H), 7,41 (dd, $J=8,6, 10,5$ Hz, 1H), 6,70 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 5,37 (s, 2H), 4,12 (d, $J=5,8$ Hz, 2H), 3,52 (br d, $J=12,8$ Hz, 2H), 3,08 - 2,96 (m, 2H), 2,85 (s, 3H), 2,26 - 2,09 (m, 3H), 1,79 - 1,63 (m, 2H).

Phương án 5



**Bước A:**

Hợp chất trung gian 5A được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1D.

Bước B:

Hợp chất trung gian 5B được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1F.

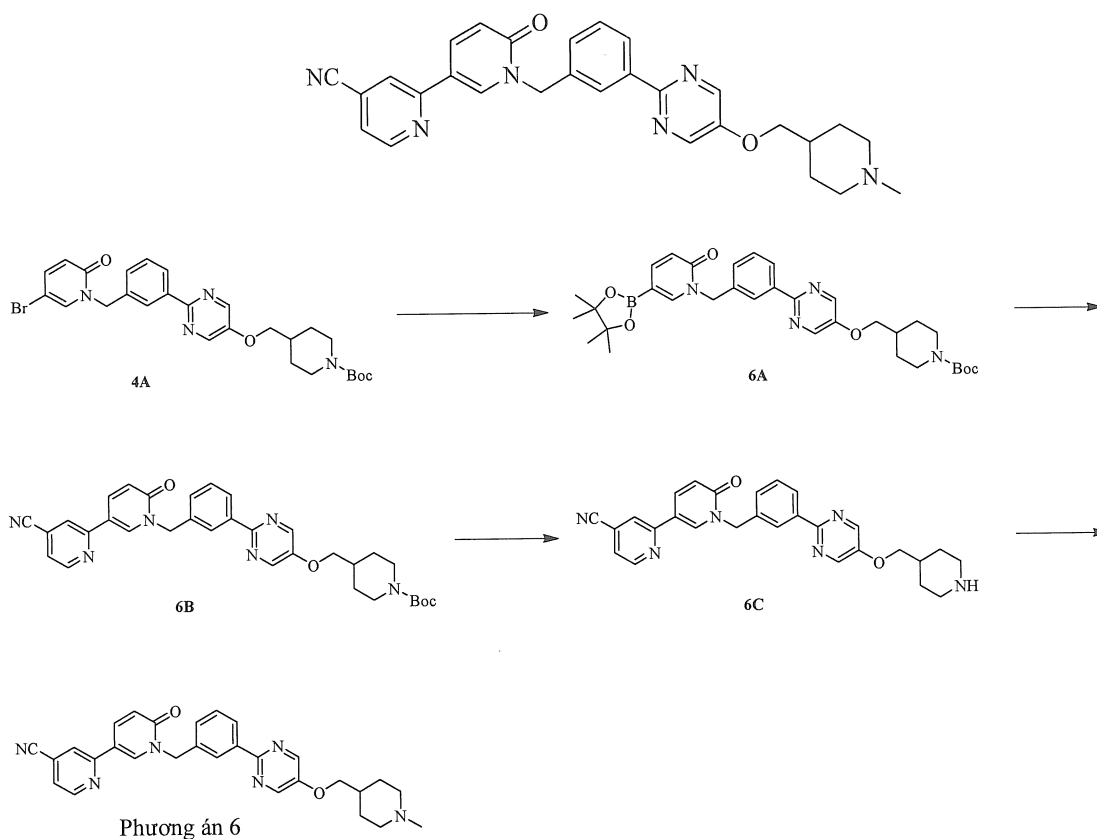
Bước C:

Hợp chất trung gian 5C được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G.

Bước D:

Phương án 5 được điều chế bằng phương pháp điều chế Phương án 1. LCMS (ESI) m/z : 506 ($M+1$). 1H NMR (400MHz, METANOL- d_4) δ = 8,58 - 8,49 (m, 3H), 8,37 - 8,26 (m, 2H), 8,16 (dd, $J=1,3, 2,1$ Hz, 1H), 7,74 (dd, $J=2,2, 10,2$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J=5,3$ Hz, 2H), 7,34 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,12 (d, $J=5,8$ Hz, 2H), 3,51 (br d, $J=12,4$ Hz, 2H), 3,06 - 2,94 (m, 2H), 2,84 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,23 - 2,07 (m, 3H), 1,80 - 1,62 (m, 2H).

Phương án 6

**Bước A:**

Hợp chất trung gian 6A được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1E.

Bước B:

Hợp chất trung gian 6B được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1F.

Bước C:

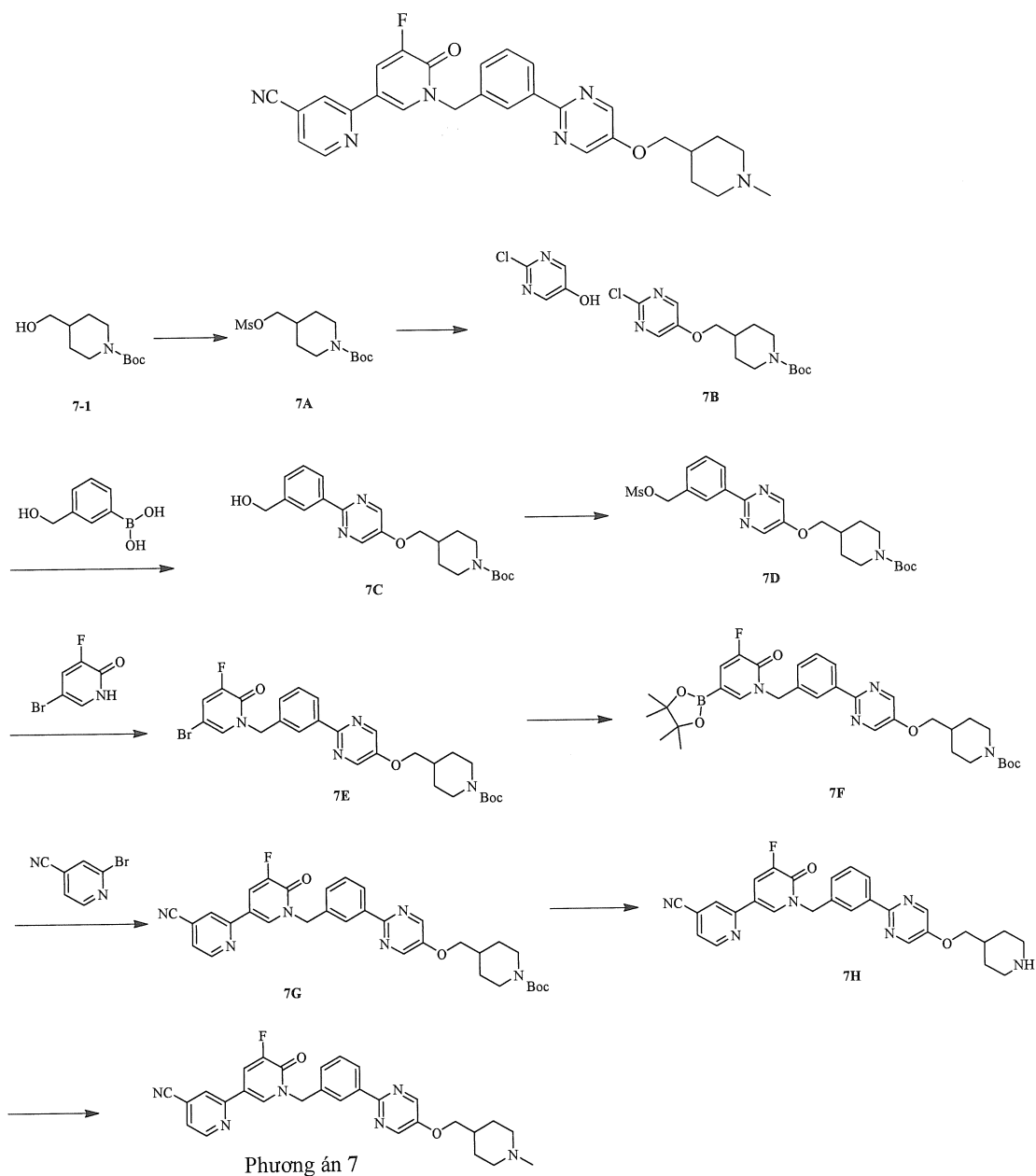
Hợp chất trung gian 6C được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G.

Bước D:

Phương án 6 được điều chế bằng phương pháp điều chế Phương án 1. LCMS (ESI) m/z : 493 ($M+1$). 1H NMR (400MHz, METANOL- d_4) δ = 8,75 (d, $J=5,0$ Hz, 1H), 8,69 (d, $J=2,4$ Hz, 1H), 8,58 - 8,43 (m, 3H), 8,34 (s, 1H), 8,30 - 8,22 (m, 2H), 8,13 (s, 1H), 7,55 (dd, $J=1,1, 5,0$ Hz, 1H), 7,51 - 7,44 (m, 2H), 6,71 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 5,39 (s, 2H),

4,10 (d, $J=5,9$ Hz, 2H), 3,54 (br d, $J=12,0$ Hz, 2H), 3,04 (br t, $J=12,0$ Hz, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,23 - 2,07 (m, 3H), 1,79 - 1,65 (m, 2H).

Phương án 7



Bước A:

Trong môi trường khí nitơ, metan disulfonyl clorua (45,15 g, 394,15 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch chứa tert-butyl-4-(hydroxymetyl)piperidin-1-carboxat (68,00 g, 315,85 mmol) và diisopropyletylamin (81,64 g, 631,71 mmol) trong diclometan (800 mL) trong khi khuấy. Sau khi bổ sung bằng cách nhỏ giọt kết thúc, dung dịch phản ứng được khuấy ở 25°C trong 2 giờ. Sắc ký lớp mỏng được sử

dụng để đảm bảo phản ứng kết thúc. Dung dịch phản ứng được rửa bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (500 mL*2) và nước muối (300 mL *2) và được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 7A (chất lỏng dạng dầu màu đỏ, 95,00 g, hiệu suất 100%) được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước B

Trong môi trường khí nitơ, kali cacbonat (74,12 g, 536,28 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 7A (94,40 g, 321,77 mmol) và 2-clopyrimidin-5-ol (35,00 g, 268,14 mmol) trong DMF (1,00 L). Dung dịch phản ứng được để ở 80°C trong 16 giờ, và sắc ký lớp mỏng được sử dụng để phát hiện sự kết thúc phản ứng. Tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được cô, tiếp theo nước (500 mL) được bổ sung vào phần cặn và được chiết bằng etyl axetat (300 mL*3). Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối (400 mL*2) và được sấy khô trên natri sulfat khan, tiếp theo được lọc và cô. Tiếp theo cặn được tinh chế bằng sắc ký cột thu được hợp chất trung gian 7B (chất rắn màu vàng nhạt, 84,00 g, hiệu suất 95,05%). LCMS (ESI) m/z: 327,7 (M+1). ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,08 - 1,25 (m, 2 H) 1,40 (s, 9 H) 1,69 - 1,78 (m, 2 H) 1,88 - 2,03 (m, 1 H) 2,58 - 2,88 (m, 2 H) 3,89 - 4,05 (m, 4 H) 8,50 - 8,57 (m, 2 H)

Bước C:

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch đã trộn chứa hợp chất trung gian 7B (84,00 g, 254,85 mmol), axit [3-(hydroxymetyl)phenyl]boronic (42,60 g, 280,34 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (17,89 g, 25,49 mmol) và kali cacbonat (70,45 g, 509,71 mmol) trong 1,4-dioxan (1,00 L) và nước (200,00 mL) được khuấy ở 80°C trong 16 giờ. Tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng tiếp theo được lọc, tiếp theo là chiết bằng diclometan (500 mL*3), tiếp theo các lớp hữu cơ được kết hợp với nhau, được rửa bằng nước muối (500 mL *2) và được sấy khô trên natri sulfat khan, tiếp theo được lọc và cô. Phần cặn được tái kết tinh bằng metanol thu được hợp chất trung gian 7C (chất rắn màu trắng, 77,60 g, hiệu suất 76,22%). LCMS (ESI) m/z: 400,1 (M+1). ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,14 - 1,31 (m, 2 H) 1,45 (s, 9 H) 1,75 - 1,87

(m, 2 H) 1,95 - 2,10 (m, 1 H) 2,66 - 2,93 (m, 2 H) 3,94 - 4,22 (m, 4 H) 4,63 (d, $J=5,62$ Hz, 2 H) 5,34 (t, $J=5,81$ Hz, 1 H) 7,41 - 7,54 (m, 2 H) 8,21 (d, $J=7,46$ Hz, 1 H) 8,35 (s, 1 H) 8,68 (s, 2 H)

Bước D:

Trong môi trường khí nitơ, metan disulfonyl clorua (3,44 g, 30,04 mmol) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 7C (10,00 g, 25,03 mmol) và diisopropyletylamin (6,47 g, 50,06 mmol) trong diclometan (100,00 mL) trong khi khuấy. Sau khi bổ sung kết thúc, dung dịch phản ứng được khuấy ở 25°C trong 2 giờ. Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để phát hiện sự kết thúc phản ứng. Dung dịch phản ứng được rửa bằng dung dịch amoni clorua bão hòa (500 mL*2) và nước muối (300 mL*2), được sấy khô trên natri clorua khan, được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 7D (chất rắn màu xám, 14,00 g, hiệu suất 100%) được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS (ESI) m/z : 478,1 (M+1).

Bước E:

Trong môi trường khí nitơ, kali cacbonat (6,95 g, 50,26 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 7D (12,00 g, 25,13 mmol) và 5-bromo-3-fluor-1-H-pyridin-2-on (5,79 g, 30,16 mmol) trong DMF (100,00 mL) ở 25°C. Dung dịch phản ứng được để ở 90°C trong 3 giờ, tiếp theo phản ứng kết thúc như được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng. Tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được cô. Phần cặn được rửa bằng nước (100 mL), được chiết bằng etyl axetat (100 mL *3) và tiếp theo pha hữu cơ được rửa bằng nước muối (200 mL*2) và được sấy khô trên natri sulfat khan, tiếp theo được lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột thu được hợp chất trung gian 7E (chất rắn màu vàng, 9,60 g, hiệu suất 66,62%). LCMS (ESI) m/z : 574,9 (M+1). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,09 - 1,27 (m, 2 H) 1,41 (s, 9 H) 1,77 (br d, $J=11,13$ Hz, 2 H) 1,90 - 2,10 (m, 1 H) 2,62 - 2,91 (m, 2 H) 3,87 - 4,14 (m, 4 H) 5,16 - 5,30 (m, 2 H) 7,39 - 7,52 (m, 2 H) 7,76 (dd, $J=9,66, 2,45$ Hz, 1 H) 8,14 - 8,19 (m, 1 H) 8,24 (d, $J=7,58$ Hz, 1 H) 8,28 (s, 1 H) 8,65 (s, 2 H)

Bước F:

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch đã trộn chứa hợp chất trung gian 7F (200,00 mg, 348,77 μmol), 4,4,5,5-tetrametyl-2-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1,3,2-dioxaborolan (92,99 mg, 366,21 μmol), Pd(dppf)Cl₂ (25,52 mg, 34,88 μmol) và kali axetat (102,68 mg, 1,05 mmol) trong 1,4-dioxan (10,00 mL) được khuấy ở 70°C trong 2 giờ thu được dung dịch chứa hợp chất trung gian 7F trong dioxan, được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước G:

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch đã trộn chứa hợp chất trung gian 7F trong dung dịch dioxan (210,00 mg, 338,43 μmol), 2-bromopyridin-4-carbonitril (185,81 mg, 1,02 mmol), Pd(dppf)Cl₂-CH₂Cl₂ (55,28 mg, 67,69 μmol) và kali cacbonat (93,55 mg, 676,86 μmol) trong 1,4-dioxan (10,00 mL) và nước (2,00 mL) được khuấy ở 80°C trong 3 giờ. Dung dịch phản ứng tiếp theo được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được lọc và cô. Cặn được hòa tan bằng cách bổ sung nước (50 mL) và được chiết bằng etyl axetat (30 mL *3). Tiếp theo các pha hữu cơ được kết hợp, được rửa bằng nước muối (30 ml *2), được sấy khô trên natri sulfat khan, tiếp theo là lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế thu được hợp chất trung gian 7G (chất rắn màu vàng, 50,00 mg, hiệu suất 24,76%). LCMS (ESI) m/z: 619,2 (M+23).

Bước H:

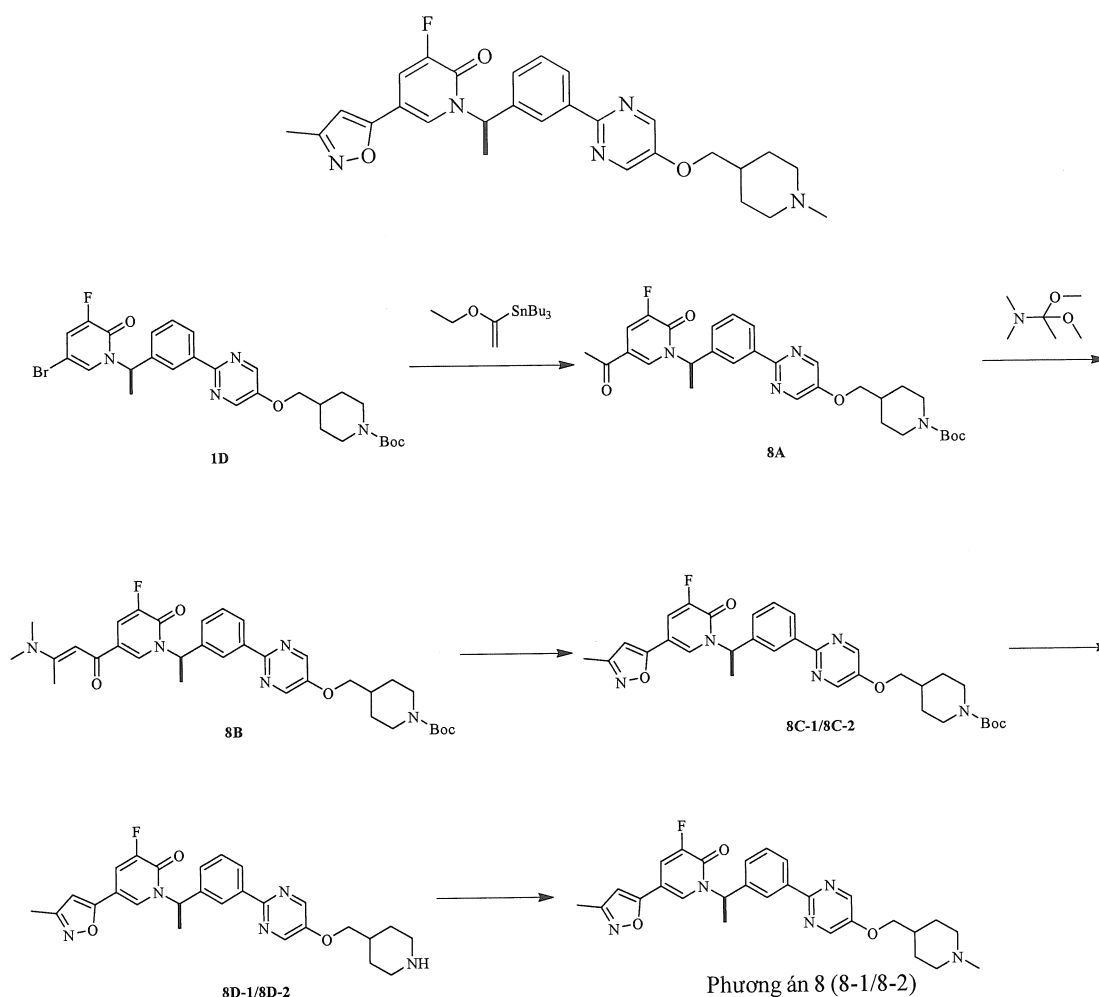
Trong môi trường khí nitơ, axit trifloaxetic (4,62 g, 40,52 mmol, 3,00 mL) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 7G (50,00 mg, 83,80 μmol) trong diclometan (10,00 mL) ở 0°C. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 25°C trong 1 giờ, tiếp theo được cô thu được hợp chất trung gian 7H (chất lỏng dạng dầu màu nâu đen, 60,00 mg, hiệu suất 100%, trifloaxetat), được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS (ESI) m/z: 497,2 (M+1).

Bước I:

Trong môi trường khí nitơ, formaldehyt (40,87 mg, 503,50 μmol , 37,50 μL , dung dịch nước 37%) và natri triaxetoxybohydrua (64,03 mg, 302,10 μmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 7H (50,00 mg, 100,70 μmol) trong diclometan

(5,00 mL) ở 0°C. Dung dịch phản ứng được để ở 25°C trong 16 giờ, tiếp theo được cô. Cặn được tinh chế bằng HPLC điều chế thu được phương án 7 (21,70 mg, hiệu suất 38,48%, format). LCMS (ESI) m/z : 511,1 (M+1). ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,27 - 1,43 (m, 2 H) 1,77 (br d, $J=9,78$ Hz, 3 H) 1,99 (br t, $J=11,43$ Hz, 2 H) 2,22 (s, 3 H) 2,85 (br d, $J=11,37$ Hz, 2 H) 4,05 (d, $J=5,99$ Hz, 2 H) 5,39 (s, 2 H) 7,50 (d, $J=5,01$ Hz, 2 H) 7,75 (dd, $J=5,01$, 1,22 Hz, 1 H) 8,18 - 8,26 (m, 2 H) 8,28 (s, 1 H) 8,33 (s, 1 H) 8,40 (s, 1 H) 8,64 (s, 2 H) 8,78 (d, $J=1,34$ Hz, 1 H) 8,82 (d, $J=5,01$ Hz, 1 H)

Phương án 8 (8-1 và 8-2)



Bước A:

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch chứa hợp chất trung gian 1D (1,50 g, 2,55 μmol), tributyl(1-etoxyetylen)thiếc (1,14 g, 3,16 mmol, 1,07 mL) và $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (358,43 mg, 510,66 μmol) trong toluen (10,00 mL) được khuấy ở 100°C trong 3 giờ.

Axit clohydric (10,21 mL, dung dịch nước 1N) được bổ sung vào dung dịch phản ứng sau khi dung dịch được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và tiếp theo dung dịch được khuấy ở 25°C trong 1 giờ, được lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột thu được hợp chất trung gian 8A (chất lỏng chứa dầu màu vàng, 1,13 g, hiệu suất 80,48%). LCMS (ESI) m/z : 573,1 ($M+23$). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 1,50 (s, 9 H) 1,89 (d, $J=7,03$ Hz, 6 H) 1,98 - 2,10 (m, 2 H) 2,31 (s, 3 H) 2,72 - 2,86 (m, 2 H) 3,98 (d, $J=6,27$ Hz, 2 H) 4,12 - 4,31 (m, 2 H) 6,54 (q, $J=7,28$ Hz, 1 H) 7,42 (br d, $J=7,65$ Hz, 1 H) 7,61 (dd, $J=9,66, 2,26$ Hz, 1 H) 7,65 - 7,74 (m, 1 H) 7,84 (d, $J=1,38$ Hz, 1 H) 8,38 (d, $J=7,78$ Hz, 1 H) 8,42 (s, 1 H) 8,47 (s, 2 H)

Bước B:

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch chứa hợp chất trung gian 8A (1,13 g, 2,05 mmol) trong 1,1-dimethoxy-N,N-dimethyl-etan (5,00 mL) được khuấy ở 120°C trong 3 giờ. Tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được cô đến khô thu được hợp chất trung gian 8B (chất lỏng dạng dầu màu nâu đen, 1,27 g, hiệu suất 100%), hợp chất này được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS (ESI) m/z : 620,1 ($M+1$).

Bước C:

Trong môi trường khí nitơ, hydroxylamin (213,61 mg, 3,08 mmol, muối hydroclorua) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 8B (1,27 g, 2,05 mmol) trong etanol (20,00 mL). Hỗn hợp được để ở 80°C trong 16 giờ, tiếp theo được cô. Cặn được tinh chế bằng HPLC điều chế, các raxemat được tách bằng SFC điều chế (cột : AS (250 mm*30 mm, 10 μm ; pha động: [0,1% $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O EtOH}$]; B%: 0%-55%, 5,2 phút; 150 minmin) thành hợp chất trung gian 8C-1 (chất rắn màu trắng, 380,00 mg, hiệu suất 31,44%, trị số ee 100%, $R_t=2,431$ phút) và hợp chất trung gian 8C-2 (chất rắn màu trắng, 350,00mg, hiệu suất 38,95%, trị số ee 100%, $R_t=3,299$ phút). LCMS (ESI) m/z : 590,4 ($M+1$). ^1H NMR (hợp chất trung gian 8C-1) (400 MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 1,31 - 1,38 (m, 2 H) 1,50 (s, 9 H) 1,82 - 1,94 (m, 5 H) 1,97 - 2,12 (m, 1 H) 2,29 (s, 3 H) 2,79 (br t, $J=12,23$ Hz, 2 H) 3,98 (d, $J=6,36$ Hz, 2 H) 4,21 (br s, 2 H) 6,06 (s, 1 H) 6,59 (d, $J=6,97$ Hz, 1 H) 7,33 (dd, $J=9,41, 2,20$ Hz, 1 H) 7,40 - 7,46 (m, 1 H) 7,48 - 7,55

(m, 1 H) 7,56 - 7,62 (m, 1 H) 8,36 (d, $J=7,70$ Hz, 1 H) 8,43 (s, 1 H) 8,47 (s, 2 H).

^1H NMR (hợp chất trung gian 8C-2) (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,30 - 1,37 (m, 2 H) 1,49 (s, 9 H) 1,81 - 1,94 (m, 5 H) 1,96 - 2,10 (m, 1 H) 2,29 (s, 3 H) 2,79 (br t, $J=12,10$ Hz, 2 H) 3,98 (d, $J=6,24$ Hz, 2 H) 4,20 (br s, 2 H) 6,06 (s, 1 H) 6,59 (q, $J=7,05$ Hz, 1 H) 7,33 (dd, $J=9,29, 2,20$ Hz, 1 H) 7,41 - 7,46 (m, 1 H) 7,48 - 7,54 (m, 1 H) 7,59 (d, $J=1,59$ Hz, 1 H) 8,36 (d, $J=7,82$ Hz, 1 H) 8,42 (s, 1 H) 8,47 (s, 2 H)

Bước D:

Hợp chất trung gian 8D-1, 8D-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G.

Bước E:

Các phương án 8-1, 8-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế theo phương án 1.

Phương án 8-1:

LCMS (ESI) m/z : 504,1 ($M+1$).

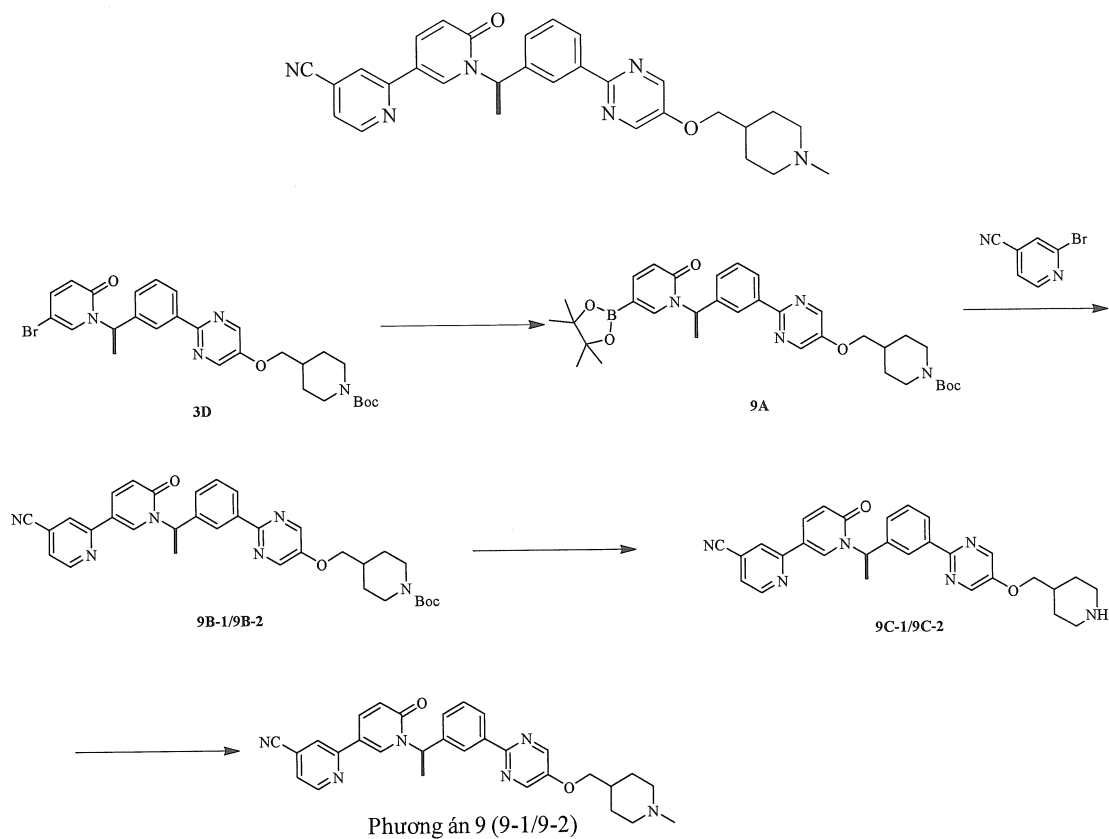
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,54 - 1,72 (m, 2 H) 1,85 - 2,13 (m, 6 H) 2,24 (s, 3 H) 2,69 - 2,80 (m, 3 H) 2,86 - 3,16 (m, 2 H) 3,19 - 3,52 (m, 2 H) 4,09 (d, $J=6,27$ Hz, 2 H) 6,29 (q, $J=7,07$ Hz, 1 H) 6,78 (s, 1 H) 7,47 - 7,60 (m, 2 H) 7,92 (dd, $J=10,42, 2,13$ Hz, 1 H) 8,08 (s, 1 H) 8,21 - 8,35 (m, 2 H) 8,62 - 8,75 (m, 2 H) 10,37 - 10,80 (m, 1 H)

Các phương án 8-2

LCMS (ESI) m/z : 504,1 ($M+1$).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,57 - 1,74 (m, 2 H) 1,81 - 2,12 (m, 6 H) 2,23 (s, 3 H) 2,62 - 2,79 (m, 3 H) 2,86 - 3,05 (m, 2 H) 3,41 (br d, $J=11,92$ Hz, 2 H) 4,09 (d, $J=6,27$ Hz, 2 H) 6,29 (q, $J=6,99$ Hz, 1 H) 6,79 (s, 1 H) 7,53 (d, $J=5,02$ Hz, 2 H) 7,92 (dd, $J=10,48, 2,07$ Hz, 1 H) 8,08 (s, 1 H) 8,20 - 8,34 (m, 2 H) 8,61 - 8,73 (m, 2 H) 10,75 (br s, 1 H)

Phương án 9



Bước A:

Trong môi trường khí nitơ, hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 3D (1,00 g, 1,76 mmol), 4,4,5,5-tetrametyl-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1,3,2-dioxaborolan (469,28 mg, 1,85 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (128,78 mg, 176,00 μmol) và kali axetat (518,17 mg, 5,28 mmol) trong 1,4-dioxan (15,00 mL) được khuấy ở 80°C trong 2 giờ, tiếp theo hợp chất trung gian 9A trong dioxan được thu và được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần xử lý thêm.

Bước B:

Trong môi trường khí nitơ, hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 9A (1,09 g, 1,77 mmol) trong dioxan, 2-bromopyridin-4-carbonitril (485,89 mg, 2,66 mmol), Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (289,09 mg, 354,00 μmol) và kali cacbonat (489,26 mg, 3,54 mmol) trong 1,4-dioxan (20,00 mL) và nước (4,00 mL) trong dung dịch được khuấy ở 80°C trong 3 giờ. Tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế, các raxemat được

tách bằng SFC điều chế (cột: AS (250 mm*30 mm, 10 μ m) ; pha động: [0,1% NH_3 - H_2O EtOH]; B%: 55%-55%, 8,2 phút; 100 minmin) thành hợp chất trung gian 9B-1 (chất lỏng chứa dầu màu vàng, 200,00 mg, trị số ee 100%, hiệu suất 19,06%, R_t =2,973 phút) và hợp chất trung gian 9B-2 (chất lỏng chứa dầu màu vàng, 200,00 mg, trị số ee 100%, hiệu suất 19,06%, R_t =3,605 phút). LCMS (ESI) m/z : 593,1 ($M+1$).

Bước C

Hợp chất trung gian 9C-1, 9C-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế 1G.

Bước D:

Phương án 9-1, 9-2 được điều chế bằng phương pháp điều chế phương án 1.

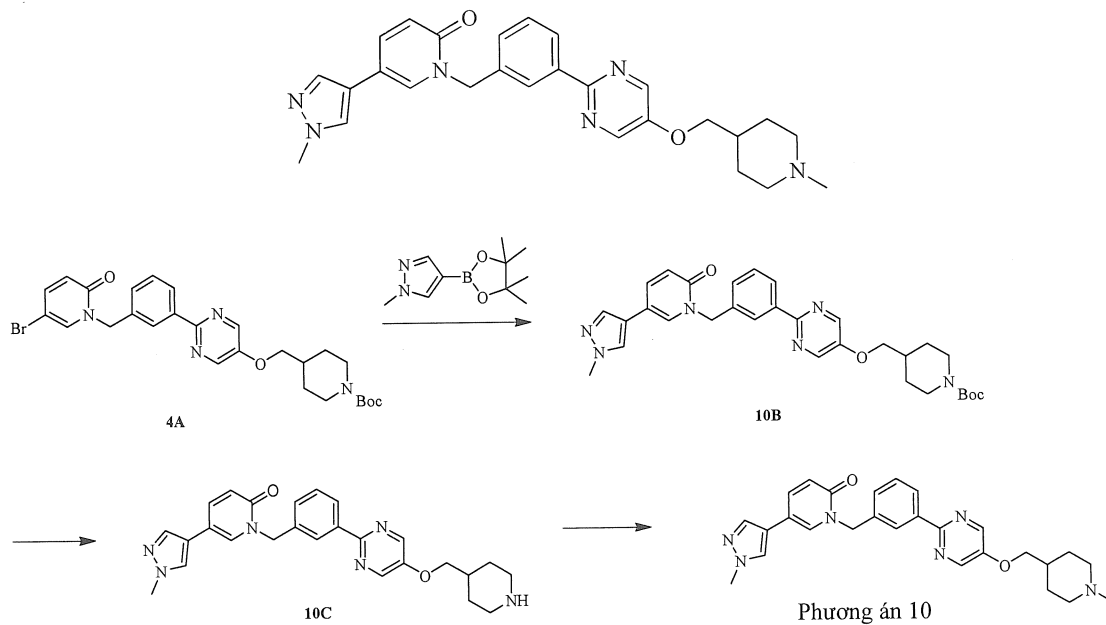
Phương án 9-1:

LCMS (ESI) m/z : 507,1 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,29 - 1,45 (m, 2 H) 1,80 (br d, J =10,54 Hz, 3 H) 1,88 (d, J =7,28 Hz, 3 H) 2,14 (br t, J =11,17 Hz, 2 H) 2,30 (s, 3 H) 2,94 (br d, J =11,29 Hz, 2 H) 4,05 (d, J =6,02 Hz, 2 H) 6,32 (d, J =7,15 Hz, 1 H) 6,62 (d, J =9,66 Hz, 1 H) 7,46 - 7,55 (m, 2 H) 7,69 (dd, J =5,02, 1,25 Hz, 1 H) 8,19 - 8,26 (m, 3 H) 8,27 (s, 1 H) 8,43 (t, J =1,07 Hz, 1 H) 8,49 (d, J =2,38 Hz, 1 H) 8,64 (s, 2 H) 8,77 (dd, J =5,02, 0,88 Hz, 1 H)

Phương án 9-2

LCMS (ESI) m/z : 507,1 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,27 - 1,46 (m, 2 H) 1,81 (br d, J =10,54 Hz, 3 H) 1,89 (d, J =7,28 Hz, 3 H) 2,17 (br t, J =11,17 Hz, 2 H) 2,31 (s, 3 H) 2,96 (br d, J =11,29 Hz, 2 H) 4,09 (d, J =6,02 Hz, 2 H) 6,35 (d, J =7,15 Hz, 1 H) 6,65 (d, J =9,66 Hz, 1 H) 7,42 - 7,57 (m, 2 H) 7,66 (dd, J =5,02, 1,25 Hz, 1 H) 8,21 - 8,27 (m, 3 H) 8,29 (s, 1 H) 8,45 (t, J =1,07 Hz, 1 H) 8,51 (d, J =2,38 Hz, 1 H) 8,67 (s, 2 H) 8,79 (dd, J =5,02, 0,88 Hz, 1 H)

Phương án 10



Bước A:

Trong môi trường khí nitơ, hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 4A (200,00 mg, 346,53 μmol), 1-metyl-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrazol (108,15 mg, 519,80 μmol), Pd(dppf)Cl₂ (25,36 mg, 34,65 μmol) và natri cacbonat (110,19 mg, 1,04 mmol) trong 1,4-dioxan (10,00 mL) được khuấy ở 80°C trong 2 giờ, tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được lọc và cô. Cặn được hòa tan bằng cách bổ sung nước (60 mL) và tiếp theo được chiết bằng etyl axetat (50 mL*3). Tiếp theo các pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng nước muối (80 mL *2), và được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế thu được hợp chất trung gian 10B (chất lỏng chứa dầu màu vàng, 200,00 mg, hiệu suất 95,45%). LCMS (ESI) m/z: 557,3 (M+1).

Bước B:

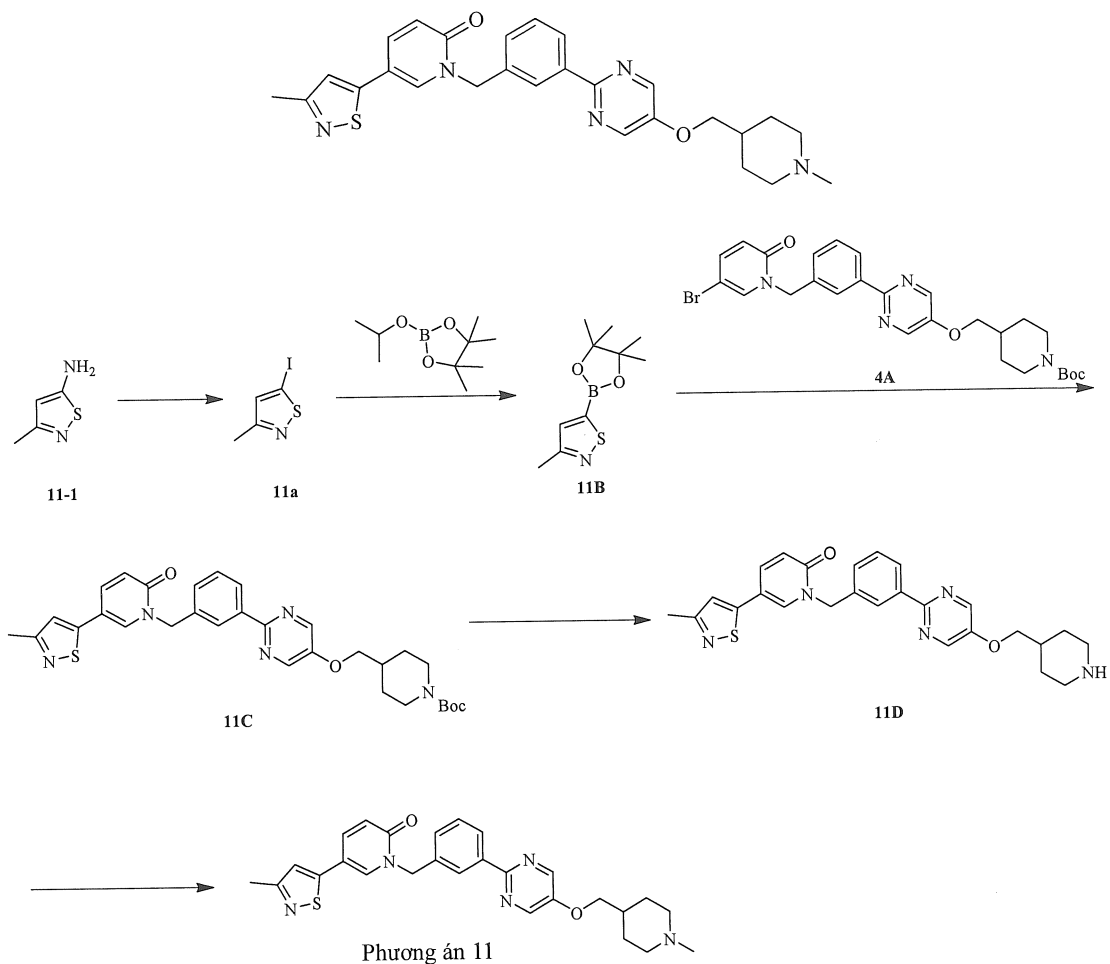
Hợp chất trung gian 10C được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G.

Bước C:

Phương án 10 được điều chế bằng phương pháp điều chế phương án 1. LCMS (ESI) m/z: 471,2 (M+1). ¹HNMR (400 MHz, METANOL-d₄): 1,63 - 1,80 (m, 2 H) 2,09 - 2,25 (m, 3 H) 2,88 (s, 3 H) 3,05 (t, J=12,17 Hz, 2 H) 3,55 (d, J=12,67 Hz, 2 H) 3,91 (s,

3 H) 4,12 (d, J=5,90 Hz, 2 H) 5,34 (s, 2 H) 6,67 (d, J=9,41 Hz, 1 H) 7,42 - 7,51 (m, 2 H) 7,75 (s, 1 H) 7,81 (dd, J=9,35, 2,57 Hz, 1 H) 7,88 (s, 1 H) 8,05 (d, J=2,38 Hz, 1 H) 8,25 - 8,29 (m, 1 H) 8,33 (s, 1 H) 8,47 (s, 1 H) 8,55 (s, 2 H).

Phương án 11



Bước A:

Trong môi trường khí nitơ, dung dịch chứa natri nitrit (2,52 g, 36,54 mmol) trong nước (50 mL) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch đã trộn chứa 3-metyisothiazol-5-amin (5,00 g, 33,19 mmol, muối hydroclorua) trong nước (14,00 mL) và axit sulfuric (10,00 mL, độ tinh khiết 98%) ở 0°C. Dung dịch phản ứng được khuấy ở 0°C trong 1 giờ, tiếp theo dung dịch chứa kali iodua (6,06 g, 36,51 mmol) trong nước (35 mL) được bổ sung và dung dịch được để ở 80°C trong 1 giờ để phản ứng. Dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được pha loãng bằng nước (100 mL) và được chiết bằng diclometan (50 mL*2). Tiếp theo pha hữu cơ được kết hợp và

được rửa bằng nước muối (25 mL*2), được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột thu được hợp chất trung gian 11A (chất rắn màu vàng, 4,00 g, hiệu suất 53,55%). LCMS (ESI) m/z : 225,9 (M+1). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 2,39 - 2,48 (m, 3 H) 7,04 - 7,13 (m, 1 H).

Bước B:

Trong môi trường khí nitơ, phức chất isopropylamagie clorua-lithi clorua (3,66 mL, dung dịch tetrahydrofuran 1,3 M) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 11A (1,00 g, 4,44 mmol) và 2-isopropoxy-4,4,5,5-1,3,2-dioxaborolan (850 mg, 4,57 mmol) trong tetrahydrofuran (5,00 mL) ở -25°C. Dung dịch phản ứng được khuấy ở -25°C trong 0,5 giờ. Sau phản ứng, dung dịch được dập tắt bằng cách nhúng vào dung dịch chứa axit axetic (0,24 mL) trong tetrahydrofuran (0,67 mL), tiếp theo ete dầu hỏa (48 mL) và tert-butyl methyl ete (24 mL) được bổ sung vào dung dịch phản ứng. Sau khi lọc, tert-butyl methyl ete (32 mL) được bổ sung vào phần lọc, tiếp theo phần lọc lại được lọc và cô thu được hợp chất trung gian 11B (chất lỏng chứa dầu màu vàng, 512 mg, hiệu suất 51,22%), hợp chất này được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,28 (s, 12 H) 2,46 - 2,48 (m, 3 H) 7,31 (s, 1 H).

Bước C:

Trong môi trường khí nitơ, hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 11B (283,69 mg, 1,26 mmol), hợp chất trung gian 4A (500,00 mg, 900,15 μmol), 1,1-di(tert-butylphosphino)feroxen paladi clorua (58,67 mg, 90,02 μmol) và kali phosphat trihydrat (479,44 mg, 1,80 mmol) trong tetrahydrofuran (5,00 mL) và nước (1,00 mL) được khuấy ở 65°C trong 12 giờ. Tiếp theo dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được lọc và cô. Sau khi cặn được hòa tan trong nước (50 mL) và được chiết bằng etyl axetat (100 mL*2), pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng nước muối (50 mL*2), được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế thu được hợp chất trung gian 11C (chất rắn màu vàng, 266,00 mg, hiệu suất 51,51%). LCMS (ESI) m/z : 574,2 (M+1). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,27 - 1,34 (m, 6 H) 1,60 - 1,64 (m, 10 H) 1,60 - 1,65 (m, 10 H)

1,83 - 1,91 (m, 2 H) 1,95 (s, 1 H) 2,46 - 2,52 (m, 3 H) 3,95 - 4,01 (m, 2 H) 5,28 - 5,31 (m, 2 H) 6,71 - 6,77 (m, 1 H) 6,94 - 6,97 (m, 1 H) 7,39 - 7,56 (m, 3 H) 7,63 - 7,68 (m, 1 H) 8,37 (s, 2 H) 8,47 (s, 2 H).

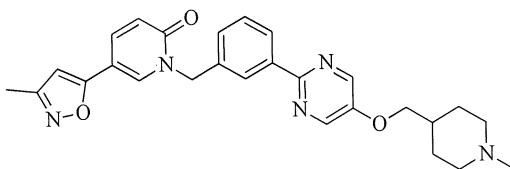
Bước D:

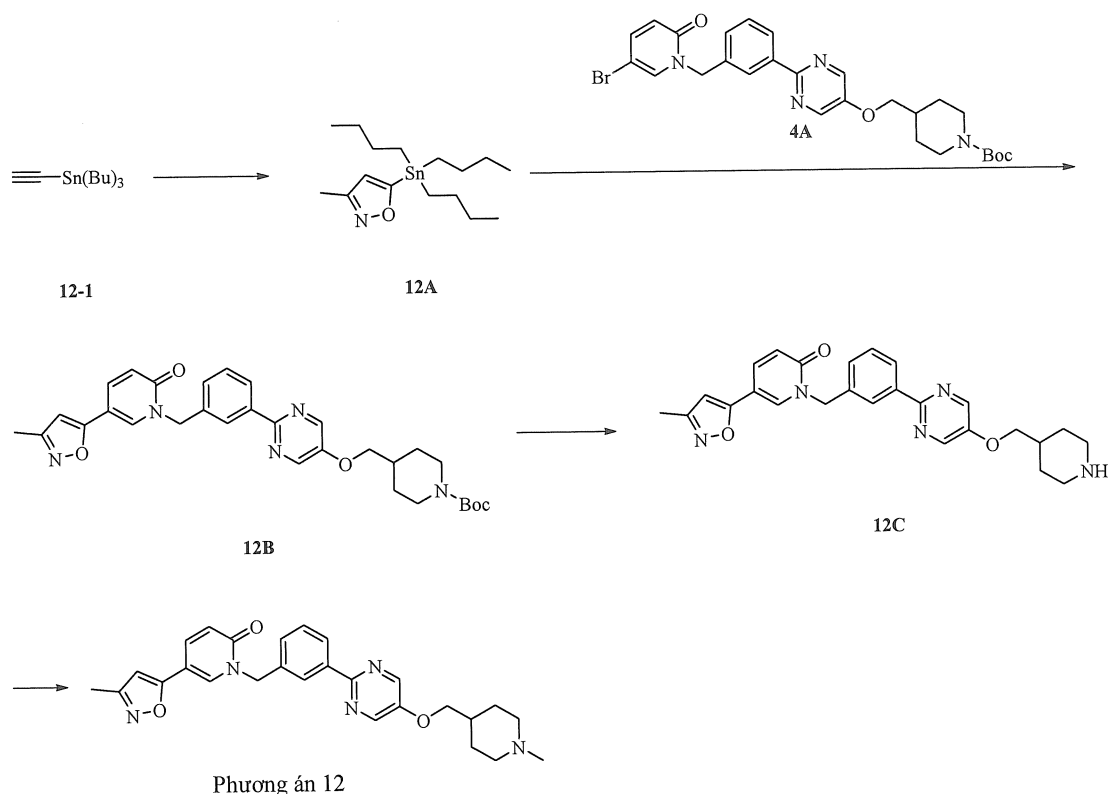
Hợp chất trung gian 11D được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1F. LCMS (ESI) m/z: 474,2 (M+1).

Bước E:

Phương án 11 được điều chế bằng phương pháp điều chế phương án 1. LCMS (ESI) m/z: 488,2 (M+1). ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,37 (br d, J=10,54 Hz, 2 H) 1,79 (br d, J=10,04 Hz, 3 H) 2,11 (br s, 2 H) 2,26 - 2,31 (m, 3 H) 2,40 - 2,44 (m, 3 H) 2,89 - 2,97 (m, 2 H) 4,01 - 4,09 (m, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 6,57 (d, J=9,41 Hz, 1 H) 7,45 (d, J=11,80 Hz, 3 H) 7,79 (dd, J=9,41, 2,64 Hz, 1 H) 8,20 - 8,26 (m, 2 H) 8,29 (s, 1 H) 8,53 - 8,56 (m, 1 H) 8,62 - 8,66 (m, 2 H).

Phương án 12





Bước A:

Triethylamin (32,08 mg, 317,00 μmol , 43,94 μL) được bổ sung vào dung dịch chứa phenyl isoxyanat (830,74 mg, 6,97 mmol) trong nitroetan (261,77 mg, 3,49 mmol, 249,30 μL) và dung dịch phản ứng được khuấy ở 50°C trong 30 phút, tiếp theo dung dịch chứa tributyl(etynyl)stanan (1,00 g, 3,17 mmol) trong toluen (8,00 mL) được bổ sung vào dung dịch phản ứng, tiếp theo là khuấy ở 50°C trong 5 giờ. Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để phát hiện sự kết thúc phản ứng. Tiếp theo nước (100 mL) được bổ sung vào dung dịch, tiếp theo được chiết bằng etyl axetat (100 mL). Pha hữu cơ tiếp theo được rửa bằng nước muối (50 mL) và được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô bằng máy làm bay hơi quay. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột thu được hợp chất trung gian 12A (chất lỏng chứa dầu màu vàng, 700,00 mg, hiệu suất 42,13%). LCMS (ESI) m/z : 373,14 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 0,82 - 0,85 (m, 9 H) 0,97 - 1,11 (m, 6 H) 1,20 - 1,34 (m, 12 H) 1,49 - 1,52 (m, 3 H) 7,18 - 7,20 (m, 1 H).

Bước B:

Hợp chất trung gian 12A (200 mg, 348,77 μmol) và $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (25,27 mg, 36,01

μmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 4A (200,00 mg, 360,06 μmol) trong dioxan (4,00 mL) ở 20°C, tiếp theo được gia nhiệt đến 100°C và được khuấy trong 12 giờ trong môi trường khí nitơ. Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để phát hiện sự kết thúc phản ứng. Tiếp theo nước (50 mL) được bổ sung vào dung dịch phản ứng và dung dịch này được chiết bằng ethyl axetat (50 mL *2). Pha hữu cơ được rửa bằng nước muối (50 mL), được sấy khô trên natri sulfat khan, được lọc và cô bằng máy làm bay hơi quay. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột thu được hợp chất trung gian 12B (chất rắn màu vàng, 110,00 mg, hiệu suất 42,18%). LCMS (ESI) m/z : 557,26 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 1,21 - 1,31 (m, 4 H) 1,40 (s, 9 H) 1,72 - 1,81 (m, 2 H) 1,89 - 1,98 (m, 1 H) 2,22 (s, 3 H) 2,70 (br s, 2 H) 3,88 (d, $J=6,36$ Hz, 2 H) 5,21 (s, 2 H) 6,02 (s, 1 H) 6,63 (d, $J=9,54$ Hz, 1 H) 7,33 - 7,37 (m, 1 H) 7,50 (dd, $J=9,54$, 2,57 Hz, 1 H) 7,57 - 7,64 (m, 1 H) 7,83 (d, $J=2,32$ Hz, 1 H) 8,23 - 8,31 (m, 2 H) 8,38 (s, 2 H).

Bước C:

Hợp chất trung gian 12C được điều chế bằng phương pháp điều chế hợp chất trung gian 1G. LCMS (ESI) m/z : 457,21 ($M+1$).

Bước D:

Phương án 12 được điều chế bằng phương pháp điều chế phương án 1. LCMS (ESI) m/z : 471,23 ($M+1$). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,14 - 1,21 (m, 2 H) 1,49 (br s, 2 H) 1,79 - 1,95 (m, 3 H) 1,99 (s, 2 H) 2,24 (s, 3 H) 2,38 - 2,38 (m, 1 H) 2,46 (s, 3 H) 3,12 (br d, $J=10,92$ Hz, 2 H) 5,29 (s, 2 H) 6,65 (s, 1 H) 7,47 (br s, 1 H) 7,82 - 7,90 (m, 1 H) 8,29 (br s, 2 H) 8,63 (s, 2 H)

Thử nghiệm 1: Thử nghiệm về hoạt tính liên kết của enzym c-MET

Chất phản ứng và vật liệu có thể dùng:

cMET (invitrogen PV3143)

Tracer 236 (số lô: 10815978)

Eu-Anti-His AB (MAb Anti 6HIS-K)

PerkinElmer corporation Envision detection 665 nm và 615 nm

384-well plate _checkerboard (PerkinElmer #6007299)

Nguyên tắc thử nghiệm:

Thí nghiệm theo sáng chế sử dụng thử nghiệm LanthaScreen™ Eu Kinase Binding Assay, như được thể hiện trên Fig. 1, phát hiện thể liên hợp Alexa Fluor hoặc kinaza kết hợp chất đánh dấu được thực hiện bằng cách bổ sung kháng thể được đánh dấu bằng Eu. Sự liên kết của chất đánh dấu và kháng thể và kinaza dẫn đến chuẩn FRET cao, trong khi bằng cách sử dụng chất ức chế kinaza thay cho chất đánh dấu có thể dẫn đến làm mất FRET.

Phương pháp thử nghiệm:

1) Kháng thể Eu-Anti-His AB, enzym cMET, chất đánh dấu Tracer236 được pha loãng.

2) Điều chế hợp chất: 10 mM hợp chất thử nghiệm và hợp chất tham chiếu được pha loãng bằng 100% DMSO đến 0,667mM, tiếp theo hệ thống đĩa chuẩn độ vi lượng hoàn toàn tự động ECHO được sử dụng để pha loãng 3 lần 8 gradien nồng độ. Các lỗ đúp lặp lại được đặt và mỗi lỗ chứa 75 nL.

3) Hỗn hợp gồm 7,5µL kháng thể (1/375 nM) và kinaza (10 nM) được bổ sung vào đĩa hợp chất, tiếp theo là bổ sung 7,5 µL Tracer (60 nM). Nồng độ cuối: cMET: 5 nM, Tracer 236: 30 nM, Eu-Anti-His AB (MAb Anti 6HIS-K): 1/750 nM.

4) Sau khi 60 phút ủ ở 4°C, việc đọc Envision được thực hiện bằng bộ đọc đĩa chuẩn độ vi lượng đa nhãn (phân tích số liệu đối với các trị số tín hiệu 665 nm/615 mm bằng Prism 5; Ex excitation light: Laser mirror 446, Em excitation light; 615 và 665 nM.

Kết quả thử nghiệm: Xem bảng 1.

Kết luận: các hợp chất theo sáng chế có tác dụng ức chế tương đối mạnh đối với enzym c-MET.

Bảng 1

Hợp chất thử nghiệm	c-MET IC ₅₀ (nM)	Hợp chất thử nghiệm	c-MET IC ₅₀ (nM)
Phương án 1-2	1,09	Phương án 7	15,50
Phương án 2-2	9,33	Phương án 8-2	3,79
Phương án 4	6,16	Phương án 10	69,50
Phương án 5	2,90	Phương án 11	5,00
Phương án 6	4,37		

Thử nghiệm 2: Thử nghiệm về tác dụng ức chế tăng sinh

Chất phản ứng và vật liệu có thể dùng:

- 1) Môi trường nuôi cấy: mô trường tế bào DMEM, huyết thanh thai bò, DPBS
- 2) Dòng tế bào: MHCC97-H
- 3) Chất phản ứng phát hiện: kit phát hiện tế bào sống CellTiter-Glo
- 4) Chất phản ứng và vật liệu có thể dùng chủ yếu khác: đĩa pha loãng hợp chất, đĩa hợp chất trung gian, đĩa thử nghiệm, DMSO

Nguyên tắc thực nghiệm:

Lượng ATP phản ánh trực tiếp số lượng tế bào và trạng thái của các tế bào, do đó số lượng tế bào sống có thể được phát hiện trực tiếp bằng cách định lượng ATP. Kit thử nghiệm tế bào sống chứa luxiferaza và cơ chất của nó. Với sự có mặt của ATP, tín hiệu quang học ổn định có thể được phát ra bởi cơ chất do luxiferaza xúc tác. Do đó, lượng ATP trong tế bào có thể được xác định bằng cách phát hiện cường độ của tín hiệu này. Tín hiệu ánh sáng tỷ lệ với lượng ATP trong tế bào, trong khi ATP tương quan với số lượng tế bào sống, nên sự tăng sinh trong tế bào có thể được phát hiện. Đĩa thử nghiệm được sử dụng được phân tích bằng Envision từ PE Corporation.

Phương pháp thử nghiệm:

1. Chuẩn bị đĩa tế bào

Tế bào MHCC97-H được cấy riêng rẽ vào các đĩa 384 lỗ, mỗi lỗ chứa 500 tế bào. Các đĩa tế bào này được đặt và ủ trong thiết bị ủ cacbon dioxit qua đêm.

2. Điều chế hợp chất.

Echo được sử dụng để pha loãng 4 lần và 9 nồng độ được điều chế, dùng ngay cho thử nghiệm lỗ đúp lặp lại.

3. Xử lý tế bào bằng hợp chất

Các hợp chất được chuyển sang đĩa tế bào ở nồng độ ban đầu là 10 μ M. Các đĩa tế bào được ủ trong thiết bị ủ cacbon dioxit trong 3 ngày.

4. Phát hiện

Chất phản ứng Promegaer-Glo được bổ sung vào đĩa tế bào và đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để ổn định tín hiệu phát quang. Bộ phân tích đa nhãn PerkinElmer Envision được sử dụng để phân tích kết quả đọc.

Kết quả thử nghiệm: Xem bảng 2:

Kết luận: các hợp chất theo sáng chế có hoạt tính ức chế tốt đối với tế bào MHCC97H.

Bảng 2

Hợp chất thử nghiệm	IC ₅₀ (nM) đối với tế bào MHCC97H	Hợp chất thử nghiệm	IC ₅₀ (nM) đối với tế bào MHCC97H
Phương án 1	8,80	Phương án 7	22,30
Phương án 2-2	13,80	Phương án 9-2	22,10
Phương án 3-2	19,0	Phương án 10	166,00
Phương án 4	72,90	Phương án 11	93,80
Phương án 5	58,80	Phương án 12	51,40

Phương án 6	32,90		
-------------	-------	--	--

Thử nghiệm 3: Thử nghiệm dược lực học trong mô hình khối u ghép khác loại dưới da tế bào ung thư gan MHCC97H

Nuôi cấy tế bào:

Tế bào MHCC97H được nuôi cấy thành lớp đơn in-vitro. Điều kiện nuôi cấy là môi trường RPMI1640 có bổ sung 10% huyết thanh thai bò đã bất hoạt bằng nhiệt, 1% kháng thể kép penicillin-streptomycin ở 37°C, 5% cacbon dioxit. Việc cắt và cấy chuyển bằng trypsin-EDTA được thực hiện hai lần/tuần. Khi tế bào ở pha sinh trưởng hàm số mũ, thu tế bào, đếm và tiêm.

Động vật:

Chuột nhắt BALB/c trần, đực, 6-8 tuần tuổi, thể trọng 18-22 g.

Tiêm khối u:

0,2 mL huyền phù tế bào chứa 5×10^6 MHCC97H được tiêm dưới da vào bên phải lưng của mỗi chuột. Thuốc được dùng theo nhóm sau khi thể tích khối u trung bình đạt đến khoảng 172 mm³. Việc phân nhóm thí nghiệm và chế độ dùng được thể hiện trong bảng dưới đây.

Mục đích thử nghiệm: nghiên cứu xem sự tăng sinh khối u có bị ức chế, làm chậm hoặc chữa khỏi hay không. Đường kính khối u được đo hai lần/tuần bằng cách sử dụng thước cặp du xích. Công thức để tính thể tích khối u là $V = 0,5a \times b^2$, và a và b lần lượt thể hiện đường kính dài và ngắn của khối u. Tác dụng kháng khối u (TGI) của các hợp chất được đánh giá bằng T-C (ngày) và T/C (%).

Kết quả thử nghiệm: xem Bảng 3.

Kết luận: các hợp chất theo sáng chế có hoạt tính ức chế khối u tốt hơn so với Tepotinib trong các thử nghiệm dược lực học của mô hình khối u ghép khác loại dưới da tế bào ung thư gan MHCC97H.

Bảng 3: Đánh giá tác dụng kháng khối u của các thuốc thử nghiệm trong mô hình ghép

khác loại tế bào ung thư gan MHCC97H (các phép tính dựa trên thể tích khối u ở ngày 24 sau khi dùng thuốc)

nhóm	Thể tích khối u (mm ³) ^a (ngày 24)	T/C (%)	TGI (%)	Trị số <i>p</i> ^b
trống	2059±305	-	-	-
(Tepotinib)	255±5	12,4	95,6	<0,001
Phương án 1-2	153±12	7,4	101,0	<0,001
Phương án 8-2	161±6	7,8	100,6	<0,001

Lưu ý:

a. trung bình ± SEM.

b. trị số *p* được tính dựa trên thể tích khối u.

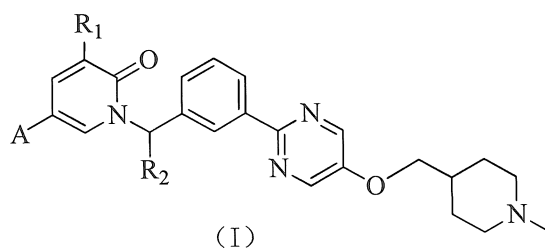
Các hợp chất theo sáng chế có độ ổn định chuyển hóa tốt hơn tepotinib. Ví dụ, $t_{1/2}$ chuyển hóa hạt gan trong ba loài gồm người, chuột cống và chuột nhắt theo phương án 1-2 lần lượt là 62,1 phút, 36,5 phút và 49,1 phút. Trong khi trong các điều kiện tương tự đối với Tepotinib trong ba loài gồm người, chuột cống và chuột nhắt, $t_{1/2}$ chuyển hóa hạt gan lần lượt là 48,3 phút, 10,5 phút và 12,4 phút. Các hợp chất theo sáng chế có thời gian bán hủy và thời gian tác động trên đích kéo dài, độ ổn định chuyển hóa được tăng cường và hoạt tính ức chế cao hơn. Việc kéo dài thời gian bán hủy có thể giữ cho nồng độ trong máu trong thời gian lâu hơn. Do đó, so với dược phẩm khác trong điều trị khối u, các hợp chất có thể làm giảm liều và khoảng cách giữa các liều sao cho sự tuân thủ của bệnh nhân có thể được cải thiện đáng kể.

Khi c-MET được kết hợp với HGF, nó hoạt hóa MAPK, PI3K/AKT, CDc42/Rac1 và các con đường khác, dẫn đến tế bào khối u sống sót và tăng sinh, nhờ đó thúc đẩy tốc độ tăng sinh khối u. Do đó, hợp chất pyridon làm chất ức chế c-Met có triển vọng ứng dụng lớn trong các thuốc điều trị nhắm đích như bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ và bệnh ung thư dạ dày. Đặc biệt trong điều trị bệnh ung thư gan, hợp chất này có tác dụng điều trị chính xác đối với bệnh ung thư gan có mức biểu hiện

c-Met cao. Do đó, hợp chất pyridon làm chất ức chế c-Met theo sáng chế được tin là thuốc mới hữu hiệu điều trị cao hơn so với các sản phẩm tương tự khác nhờ hoạt tính ức chế đáng kể của nó in vivo và in vitro, cũng như tính ổn định chuyển hóa tốt của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó,



R_1 được chọn từ H hoặc F;

R_2 được chọn từ H hoặc CH_3 ;

trong khi R_2 không phải là H, cấu hình của nguyên tử cacbon gắn với R_2 là R hoặc S;

A được chọn từ nhóm gồm phenyl, pyridyl, pyrazolyl, isoxazolyl, isothiazolyl và thiazolyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_3 ;

R_3 được chọn từ CN, halogen, $C(=O)NH_2$, hoặc được chọn từ nhóm gồm C_{1-6} alkyl, C_{1-6} heteroalkyl, và C_{3-6} xycloalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_0 ;

R_0 được chọn từ F, Cl, Br, I, OH, CN, NH_2 , $C(=O)NH_2$, hoặc được chọn từ nhóm gồm C_{1-3} alkyl và C_{1-3} heteroalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R' ;

R' được chọn từ F, Cl, Br, I, CN, OH, NH_2 , CH_3 , CH_3CH_2 , CF_3 , CHF_2 hoặc CH_2F ;

“hetero” trong C_{1-3} heteroalkyl hoặc C_{1-6} heteroalkyl được chọn từ nhóm gồm -O-, - $C(=O)NR'$ -, - $C(=O)NH$ -, - NR' -, và -NH-;

trong trường hợp bất kỳ trên đây, số nguyên tử khác loại hoặc nhóm nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ 1, 2 hoặc 3.

2. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1, trong đó, R_0 được chọn từ F, Cl, Br, I, OH, CN, NH_2 , $C(=O)NH_2$, CH_3 , CH_3CH_2 , CF_3 , CHF_2 , CH_2F , NH_2CH_2 , $(NH_2)_2CH$, CH_3O , CH_3CH_2O , CH_3OCH_2 , CH_3NH hoặc $(CH_3)_2N$.

3. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó, R_1 là H.

4. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó, R_1

là F.

5. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó, R_2 là H.

6. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó, R_2 là CH_3 .

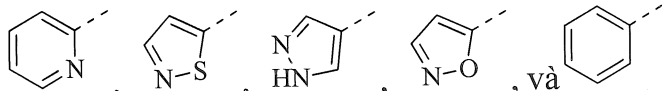
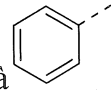
7. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 6, trong đó, cấu hình của nguyên tử cacbon gắn với R_2 là R.

8. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 6, trong đó, cấu hình của nguyên tử cacbon gắn với R_2 là S.

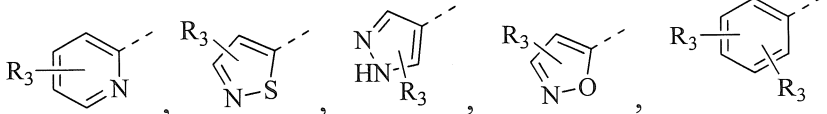
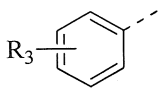
9. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó, R_3 được chọn từ CN, halogen, $C(=O)NH_2$, hoặc được chọn từ nhóm gồm C_{1-3} alkyl và C_{1-3} heteroalkyl, mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_0 .

10. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 9, trong đó, R_3 được chọn từ CN, F, Cl, Br, CH_3 , CH_3CH_2 , CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_3O hoặc $C(=O)NH_2$.

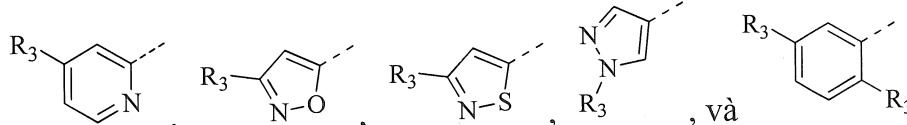
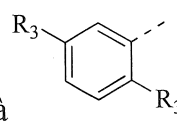
11. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 1 hoặc 2, trong đó, A

được chọn từ nhóm gồm , và , mỗi gốc này tùy ý được thế bằng 1, 2 hoặc 3 R_3 .

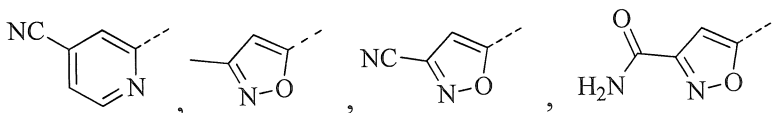
12. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 11, trong đó, A được

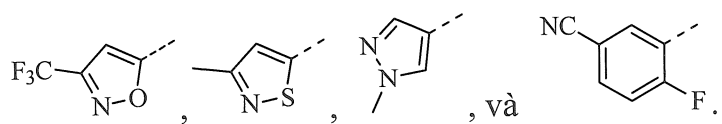
chọn từ nhóm gồm , và .

13. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 12, trong đó, A được

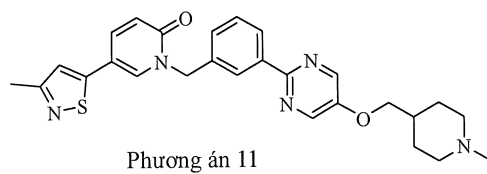
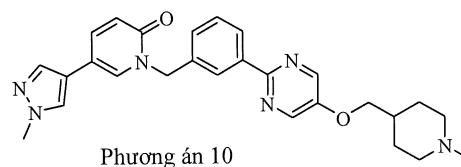
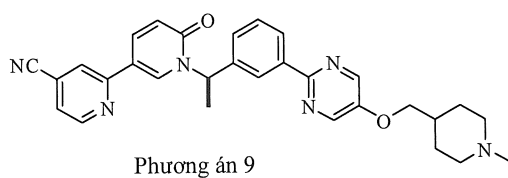
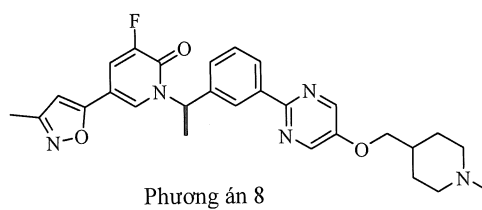
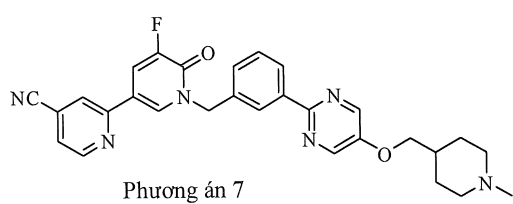
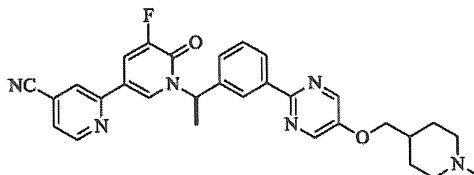
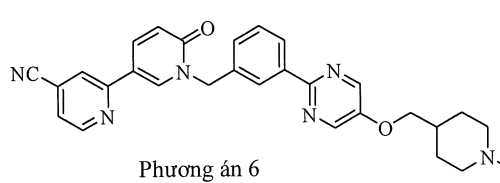
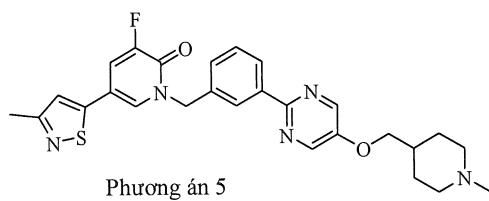
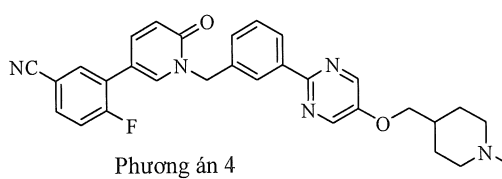
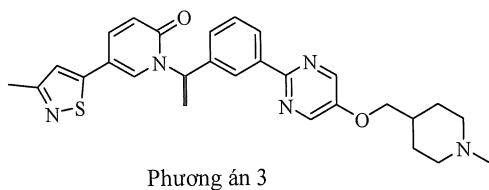
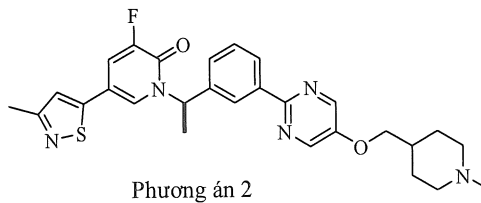
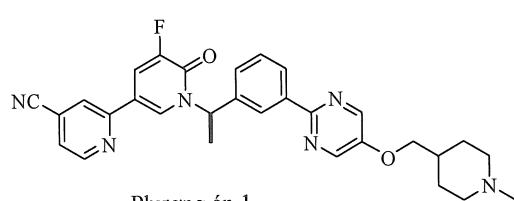
chọn từ nhóm gồm , và .

14. Hợp chất hoặc muối được dụng như được xác định theo điểm 10 hoặc 13, trong đó,

A được chọn từ nhóm gồm .



15. Hợp chất như được xác định theo điểm 1 được chọn từ nhóm gồm



16. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất hoặc muối dược dụng của nó như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-15, cũng như chất mang dược dụng.