



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

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



1-0040837

(51)⁸ C07D 401/12; A61P 17/00; A61P 35/00; (13) B
A61P 9/00; A61K 31/4439; A61P 29/00

(21) 1-2017-02023

(22) 25/11/2015

(86) PCT/EP2015/077596 25/11/2015

(87) WO2016/083433 02/06/2016

(30) 14195032.9 26/11/2014 EP

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/10/2017 355A

(73) BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (DE)

Müllerstr. 178, 13353 Berlin, Germany

(72) BOTHE, Ulrich (DE); SIEBENEICHER, Holger (DE); SCHMIDT, Nicole (DE);
NUBBEMEYER, Reinhard (DE); BÖMER, Ulf (DE); GÜNTHER, Judith (DE);
STEUBER, Holger (DE); LANGE, Martin (DE); STEGMANN, Christian (DE);
SUTTER, Andreas (DE); RAUSCH, Alexandra (DE); FRIEDRICH, Christian (DE);
HAUFF, Peter (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT INDAZOL ĐƯỢC THỂ, QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất indazol được thể, quy trình điều chế hợp chất này, và dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất theo sáng chế đơn độc hoặc kết hợp hữu dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh, và hữu dụng để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh, đặc biệt là để điều trị và/hoặc phòng ngừa lạc nội mạc tử cung và đau liên quan đến lạc nội mạc tử cung và các triệu chứng liên quan đến lạc nội mạc tử cung như đau bụng kinh, đau giao hợp, tiêu buốt và đau khi đại tiện, u lympho, viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp (đặc biệt là viêm cột sống dính khớp vảy nến và bệnh Bekhterev), lupus ban đỏ, đa xơ cứng, thoái hóa điểm vàng, COPD, gút, các rối loạn gan nhiễm mỡ, kháng insulin, các rối loạn khối u và bệnh vảy nến.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất indazol, quy trình điều chế chúng và các hợp chất trung gian để sử dụng trong điều chế các hợp chất này. Các hợp chất indazol được thể này hữu dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh và để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh, đặc biệt là các rối loạn tăng sinh, rối loạn tự miễn, rối loạn chuyển hóa và viêm, ví dụ viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp (đặc biệt viêm cột sống dính khớp vảy nến và bệnh Bekhterev), bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease, viết tắt là: COPD), đa xơ cứng, lupus ban đỏ hệ thống, gút, hội chứng chuyển hóa, viêm gan nhiễm mỡ, kháng insulin, lạc nội mạc tử cung và đau do viêm hoặc đau mạn tính, và u lympho.

Sáng chế đề cập đến các hợp chất indazol được thể mới có công thức chung (I) mà ức chế kinaza 4 có liên quan đến thụ thể interleukin-1 (IRAK4).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

IRAK4 (kinaza 4 có liên quan đến thụ thể interleukin-1) của người đóng vai trò chính trong sự hoạt hóa hệ miễn dịch. Do đó, kinaza này là phân tử đích điều trị quan trọng để phát triển các chất ức chế viêm. IRAK4 được biểu hiện bởi nhiều tế bào và làm trung gian dẫn truyền tín hiệu của các thụ thể giống Toll (TLR), trừ TLR3, và các thụ thể của họ interleukin (IL)-1 β bao gồm IL-1R (thụ thể), IL-18R, IL-33R và IL-36R (Janeway and Medzhitov, Annu. Rev. Immunol., 2002; Dinarello, Annu. Rev. Immunol., 2009; Flannery and Bowie, Biochemical Pharmacology, 2010).

Tế bào chuột đã bất hoạt gen IRAK4 hoặc tế bào người từ bệnh nhân thiếu IRAK4 không phản ứng với kích thích của các TLR (trừ TLR3) và họ IL-1 β (Suzuki, Suzuki, et al., Nature, 2002; Davidson, Currie, et al., The Journal of Immunology, 2006; Ku, von Bernuth, et al., JEM, 2007; Kim, Staschke, et al., JEM, 2007).

Sự liên kết của các phối tử TLR hoặc các phối tử của họ IL-1 β với thụ thể tương ứng dẫn đến sự thu thập và liên kết của MyD88 [gen đáp ứng sơ cấp biệt hóa tủy (88)] với thụ thể. Kết quả là, MyD88 tương tác với IRAK4, gây ra sự tạo thành phức hoạt

động mà tương tác với và hoạt hóa các kinaza IRAK1 hoặc IRAK2 (Kollewe, Mackensen, et al., Journal of Biological Chemistry, 2004; Precious et al., J. Biol. Chem., 2009). Kết quả của việc này là hoạt hóa đường truyền tín hiệu NF (yếu tố nhân)- κ B và đường truyền tín hiệu MAPK (protein kinaza được hoạt hóa bằng mitogen) (Wang, Deng, et al., Nature, 2001). Sự hoạt hóa cả đường truyền tín hiệu NF- κ B và đường truyền tín hiệu MAPK dẫn đến các quá trình kết hợp với các quá trình miễn dịch khác nhau. Ví dụ, tăng biểu hiện nhiều phân tử tín hiệu viêm và các enzym khác nhau như các xytokin, các chemokin và COX-2 (xyclooxygenaza-2), và tăng độ ổn định mRNA của các gen có liên quan đến viêm, ví dụ COX-2, IL-6 (interleukin-6), IL-8 (Holtmann, Enninga, et al., Journal of Biological Chemistry, 2001; Datta, Novotny, et al., The Journal of Immunology, 2004). Hơn nữa, các quy trình này có thể có liên quan đến sự tăng sinh và biệt hóa của các loại tế bào cụ thể, ví dụ bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào đuôi gai, tế bào T và tế bào B (Wan, Chi, et al., Nat Immunol, 2006; McGettrick and J. O'Neill, British Journal of Haematology, 2007).

Vai trò trung tâm của IRAK4 trong bệnh lý học của các rối loạn viêm khác nhau đã được chứng minh bằng cách so sánh trực tiếp giữa chuột kiểu hoang dại (WT) với động vật biến đổi gen có dạng IRAK4 bị bất hoạt bởi kinaza (IRAK4 KDKI). Các động vật IRAK4 KDKI có hình ảnh lâm sàng cải thiện trong mẫu động vật bị bệnh đa xơ cứng, xơ vữa động mạch, nhồi máu cơ tim và bệnh Alzheimer (Rekhter, Staschke, et al., Biochemical và Biophysical Research Communication, 2008; Maekawa, Mizue, et al., Circulation, 2009; Staschke, Dong, et al., The Journal of Immunology, 2009; Kim, Febbraio, et al., The Journal of Immunology, 2011; Cameron, Tse, et al., The Journal of Neuroscience, 2012). Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng, việc loại bỏ IRAK4 ở mô hình động vật sẽ bảo vệ chống lại bệnh viêm cơ tim do virus nhờ phản ứng kháng virus được cải thiện cùng với sự giảm đồng thời quá trình viêm hệ thống (Valaperti, Nishii, et al., Circulation, 2013). Cũng đã chứng tỏ được rằng sự biểu hiện IRAK4 tương ứng với hoạt tính bệnh của hội chứng Vogt-Koyanagi-Harada (Sun, Yang, et al., PLoS ONE, 2014). Ngoài ra, mối liên quan chặt chẽ của IRAK4 trong sự sản sinh IFN α (interferon-alpha) qua trung gian phức miễn dịch bởi các tế bào đuôi gai dạng tương bào, quy trình chính trong sinh bệnh học lupus ban đỏ hệ thống (SLE) đã được chứng tỏ (Chiang et al., The Journal of Immunology, 2010). Hơn nữa, đường truyền tín hiệu này có liên quan đến bệnh béo phì (Ahmad, R., P. Shihab, et al., Diabetology & Metabolic Syndrome, 2015).

Cũng như vai trò chính của IRAK4 trong miễn dịch bẩm sinh, cũng có dấu hiệu cho thấy rằng IRAK4 ảnh hưởng đến sự biệt hóa các tế bào T Th17, các thành phần miễn dịch thích ứng. Khi không có hoạt tính IRAK4 kinaza, ít tế bào T sản sinh IL-17 (tế bào T Th17) được tạo thành hơn so với chuột WT. Sự ức chế IRAK4 có khả năng phòng ngừa và/hoặc điều trị xơ vữa động mạch, đái tháo đường typ 1, viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp (đặc biệt là viêm cột sống dính khớp vảy nến và bệnh Bekhterev), lupus ban đỏ, bệnh vảy nến, bạch biến, viêm động mạch tế bào khổng lồ, rối loạn viêm ruột mạn tính và các rối loạn do virus, ví dụ HIV (virus suy giảm miễn dịch ở người), virus viêm gan (Staschke, et al., *The Journal of Immunology*, 2009; Marquez, et al., *Ann Rheum Dis*, 2014; Zambrano-Zaragoza, et al., *International Journal of Inflammation*, 2014; Wang, et al., *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015; Ciccia, et al., *Rheumatology*, 2015).

Do vai trò trung tâm của IRAK4 trong tăng tín hiệu qua trung gian MyD88 của các TLR (ngoại trừ TLR3) và họ thụ thể IL-1, việc ức chế IRAK4 có thể được sử dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn được trung gian bởi các thụ thể nêu trên. Các TLR và cả các thành phần của họ thụ thể IL-1 có liên quan đến sinh bệnh học của bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, bệnh viêm khớp, bệnh nhược cơ, bệnh viêm mạch, ví dụ bệnh Behçet, u hạt với viêm đa mạch và viêm động mạch tế bào khổng lồ, viêm tụy, lupus ban đỏ hệ thống, viêm da cơ và viêm đa cơ, hội chứng chuyển hóa bao gồm, ví dụ, kháng insulin, cao huyết áp, rối loạn chuyển hóa lipoprotein huyết và bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường (typ 1 và typ 2), bệnh thận tiểu đường, viêm xương khớp, hội chứng Sjögren và nhiễm trùng huyết (Yang, Tuzun, et al., *J Immunol*, 2005; Candia, Marquez et al., *The Journal of Rheumatology*, 2007; Scanzello, Plaas, et al. *Curr Opin Rheumatol*, 2008; Deng, Ma-Krupa, et al., *Circ Res*, 2009; Roger, Froidevaux, et al, *PNAS*, 2009; Devaraj, Tobias, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011; Kim, Cho, et al., *Clin Rheumatol*, 2010; Carrasco et al., *Clinical và Experimental Rheumatology*, 2011; Gambuzza, Licata, et al., *Journal of Neuroimmunology*, 2011; Fresno, *Archives Of Physiology and Biochemistry*, 2011; Volin and Koch, *J Interferon Cytokine Res*, 2011; Akash, Shen, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012; Goh and Midwood, *Rheumatology*, 2012; Dasu, Ramirez, et al., *Clinical Science*, 2012; Ouziel, Gustot, et al., *Am J Patho*, 2012; Ramirez and Dasu, *Curr Diabetes Rev*, 2012, Okiyama et al., *Arthritis Rheum*, 2012; Chen et al., *Arthritis Research & Therapy*, 2013; Holle,

Windmoller, et al., *Rheumatology (Oxford)*, 2013; Li, Wang, et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 2013; Sedimbi, Hagglof, et al., *Cell Mol Life Sci*, 2013; Caso, Costa, et al., *Mediators of Inflammation*, 2014; Cordiglieri, Marolda, et al., *J Autoimmun*, 2014; Jialal, Major, et al., *J Diabetes Complications*, 2014; Kaplan, Yazgan, et al., *Scand J Gastroenterol*, 2014; Talabot-Aye, et al., *Cytokine*, 2014; Zong, Dorph, et al., *Ann Rheum Di*, 2014; Ballak, Stienstra, et al., *Cytokine*, 2015; Timper, Seelig, et al., *J Diabetes Complications*, 2015). Các bệnh về da như bệnh vẩy nến, viêm da cơ địa, hội chứng Kindler, bóng nước dạng pemphigus, viêm da tiếp xúc dị ứng, rụng tóc thành đám, trứng cá đầu đen và trứng cá thông thường có liên quan đến đường truyền tín hiệu TLR qua trung gian IRAK4 cũng như họ IL-1R (Schmidt, Mitnacht, et al., *J Dermatol Sci*, 1996; Hoffmann, *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1999; Gilliet, Conrad, et al., *Archives of Dermatology*, 2004; Niebuhr, Langnickel, et al., *dị ứng*, 2008; Miller, *Adv Dermatol*, 2008; Terhorst, Kalali, et al., *Am J Clin Dermatol*, 2010; Viguier, Guigue, et al., *Annals of Internal Medicine*, 2010; Cevikbas, Steinhoff, *J Invest Dermatol*, 2012; Minkis, Aksentijevich, et al., *Archives of Dermatology*, 2012; Dispenza, Wolpert, et al., *J Invest Dermatol*, 2012; Minkis, Aksentijevich, et al., *Archives of Dermatology*, 2012; Gresnigt and van de Veerdonk, *Seminars in Immunology*, 2013; Selway, Kurczab, et al., *BMC Dermatology*, 2013; Sedimbi, Hagglof, et al., *Cell Mol Life Sci*, 2013; Wollina, Koch, et al. *Indian Dermatol Online*, 2013; Foster, Baliwag, et al., *The Journal of Immunology*, 2014).

Các rối loạn về phổi như bệnh xơ hóa phổi, bệnh phổi tắc nghẽn (COPD), hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển (ARDS), tổn thương phổi cấp (ALI), bệnh phổi mô kẽ (ILD), bệnh sacoit và tăng áp phổi cũng thể hiện mối liên quan đến các đường tín hiệu qua trung gian TLR khác nhau. Sinh bệnh học của các rối loạn về phổi có thể bị ảnh hưởng các quá trình nhiễm trùng hoặc không nhiễm trùng (Ramirez Cruz, Maldonado Bernal, et al., *Rev Alerg Mex*, 2004; Jeyaseelan, Chu, et al., *Infection and Immunity*, 2005; Seki, Tasaka, et al., *Inflammation Research*, 2010; Xiang, Fan, et al., *Mediators of Inflammation*, 2010; Margaritopoulos, Antoniou, et al., *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2010; Hilberath, Carlo, et al., *The FASEB Journal*, 2011; Nadigel, Prefontaine, et al., *Respiratory Research*, 2011; Kovach and Standiford, *International Immunopharmacology*, 2011; Bauer, Shapiro, et al., *Mol Med*, 2012; Deng, Yang, et al., *PLoS One*, 2013; Freeman, Martinez, et al., *Respiratory Research*, 2013; Dubaniewicz,

A., Human Immunology, 2013). Các TLR và các thành viên thuộc họ IL-1R cũng có liên quan đến sinh bệnh học của các rối loạn viêm khác như dị ứng, bệnh Behçet, gút, lupus ban đỏ, bệnh Still khởi phát ở người lớn, viêm màng ngoài tim và bệnh viêm ruột mạn tính như viêm loét đại tràng và bệnh Crohn, thải loại mảnh ghép và phản ứng ghép chống chủ, và do đó sự ức chế IRAK4 ở đây là cách tiếp cận thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị (Liu-Bryan, Scott, et al., Arthritis & Rheumatism, 2005; Piggott, Eisenbarth, et al., J Clin Invest, 2005; Christensen, Shupe, et al., Immunity, 2006; Cario, Inflammatory Bowel Diseases, 2010; Nickerson, Christensen, et al., The Journal of Immunology, 2010; Rakoff-Nahoum, Hao, et al., Immunity, 2006; Heimesaat, Fischer, et al., PLoS ONE, 2007; Heimesaat, Nogai, et al., Gut, 2010; Kobori, Yagi, et al., J Gastroenterol, 2010; Schmidt, Raghavan, et al., Nat Immunol, 2010; Shi, Mucsi, et al., Immunological Reviews, 2010; Leventhal and Schroppel, Kidney Int, 2012; Chen, Lin, et al., Arthritis Res Ther, 2013; Hao, Liu, et al., Curr Opin Gastroenterol, 2013; Kreisel and Goldstein, Transplant International, 2013; Li, Wang, et al., Pharmacology & Therapeutics, 2013; Walsh, Carthy, et al., Cytokine & Growth Factor Reviews, 2013; Zhu, Jiang, et al., Autoimmunity, 2013; Yap and Lai, Nephrology, 2013; Vennegaard, Dyring-Andersen, et al., Contact Dermatitis, 2014; D'Elia, Brucato, et al., Clin Exp Rheumatol, 2015; Jain, Thongprayoon, et al., Am J Cardiol., 2015; Li, Zhang, et al., Oncol Rep., 2015).

Các rối loạn phụ khoa trung gian bởi TLR và họ IL-1R, như lạc nội mạc tử cung, đau bụng kinh, đau giao hợp và lạc nội mạc tử cung, đặc biệt là đau có liên quan đến lạc nội mạc tử cung và các triệu chứng liên quan đến lạc nội mạc tử cung khác như đau bụng kinh, đau giao hợp, tiểu buốt và đau khi đại tiện, có thể được tác động tích cực nhờ việc dùng các chất ức chế IRAK4 để phòng ngừa và/hoặc điều trị (Akoum, Lawson, et al., Human Reproduction, 2007; Allhorn, Boing, et al., Reproductive Biology and Endocrinology, 2008; Lawson, Bourcier, et al., Journal of Reproductive Immunology, 2008; Sikora, Mielczarek-Palacz, et al., American Journal of Reproductive Immunology, 2012; Khan, Kitajima, et al., Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2013; Santulli, Borghese, et al., Human Reproduction, 2013). Việc sử dụng các chất ức chế IRAK4 trong phòng ngừa và/hoặc điều trị cũng có thể có tác dụng tích cực đến chứng xơ vữa động mạch (Seneviratne, Sivagurunathan, et al.,

Clinica Chimica Acta, 2012; Falck-Hansen, Kassiteridi, et al., International Journal of Molecular Sciences, 2013; Sedimbi, Hagglof, et al., Cell Mol Life Sci, 2013).

Ngoài các rối loạn đã nêu, các quá trình TLR trung gian bởi IRAK4 đã được mô tả trong sinh bệnh học của các rối loạn về mắt như thiếu máu võng mạc, bệnh viêm giác mạc, bệnh viêm kết mạc dị ứng, bệnh viêm kết giác mạc khô, thoái hóa điểm vàng và viêm màng mạch nhỏ (Kaarniranta and Salminen, J Mol Med (Berl), 2009; Sun and Pearlman, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009; Redfern and McDermott, Experimental Eye Research, 2010; Kezic, Taylor, et al., J Leukoc Biol, 2011; Chang, McCluskey, et al., Clinical & Experimental Ophthalmology, 2012; Guo, Gao, et al., Immunol Cell Biol, 2012; Lee, Hattori, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012; Qi, Zhao, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014).

Sự ức chế IRAK4 cũng là cách điều trị thích hợp đối với các rối loạn xơ hóa, ví dụ xơ gan, viêm cơ tim, xơ gan mật nguyên phát, xơ nang (Zhao, Zhao, et al., Scand J Gastroenterol, 2011; Benias, Gopal, et al., Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012; Yang, L. and E. Seki, Front Physiol, 2012; Liu, Hu, et al., Biochim Biophys Acta., 2015).

Nhờ có vị thế chính của IRAK4 trong các rối loạn qua trung gian TLR- và họ IL-1R, có thể điều trị các rối loạn mạn tính ở gan, ví dụ viêm gan nhiễm mỡ và đặc biệt là bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD) và/hoặc viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), viêm gan nhiễm mỡ do rượu (alcoholic steatohepatitis - ASH) theo cách phòng ngừa và/hoặc điều trị bằng chất ức chế IRAK4 (Nozaki, Saibara, et al., Alcohol Clin Exp Res, 2004; Csak, T., A. Velayudham, et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011; Miura, Kodama, et al., Gastroenterology, 2010; Kamari, Shaish, et al., J Hepatol, 2011; Ye, Li, et al., Gut, 2012; Roh, Seki, J Gastroenterol Hepatol, 2013; Ceccarelli, S., V. Nobili, et al., World J Gastroenterol, 2014; Miura, Ohnishi, World J Gastroenterol, 2014; Stojasavljevic, Palcic, et al., World J Gastroenterol, 2014).

Nhờ vai trò trung tâm của IRAK4 trong các quá trình qua trung gian TLR, việc ức chế IRAK4 cũng dẫn đến khả năng điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn tim mạch và thần kinh, ví dụ thương tổn tái tưới máu cơ tim, nhồi máu cơ tim, cao huyết áp (Oyama, Blais, et al., Circulation, 2004; Timmers, Sluijter, et al., Circulation Research,

2008; Fang and Hu, *Med Sci Monit*, 2011; Bijani, *International Reviews of Immunology*, 2012; Bomfim, Dos Santos, et al., *Clin Sci (Lond)*, 2012; Christia and Frangogiannis, *European Journal of Clinical Investigation*, 2013; Thompson and Webb, *Clin Sci (Lond)*, 2013; Hernanz, Martínez-Revelles, et al., *British Journal of Pharmacology*, 2015; Frangogiannis, *Curr Opin Cardiol*, 2015; Bomfim, Echem, et al., *Life Sciences*, 2015), và cả bệnh Alzheimer, đột quỵ, chấn thương sọ não, xơ cứng teo cơ một bên (amyotrophic lateral sclerosis - ALS) và bệnh Parkinson (Brough, Tyrrell, et al., *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011; Carty and Bowie, *Biochemical Pharmacology*, 2011; Denes, Kitazawa, Cheng, et al., *The Journal of Immunology*, 2011; Lim, Kou, et al., *The American Journal of Pathology*, 2011; Béraud and Maguire-Zeiss, *Parkinsonism & Related Disorders*, 2012; Denes, Wilkinson, et al., *Disease Models & Mechanisms*, 2013; Noelker, Morel, et al., *Sci. Rep.*, 2013; Wang, Wang, et al., *Stroke*, 2013; Xiang, Chao, et al., *Rev Neurosci*, 2015; Lee, Lee, et al., *J Neuroinflammation*, 2015).

Nhờ mối liên quan của các tín hiệu qua trung gian TLR và các tín hiệu qua trung gian họ thụ thể IL-1 thông qua IRAK4 trong trường hợp ngứa và đau, bao gồm đau do viêm và do bệnh thần kinh cấp tính, mạn tính, có thể cho rằng việc ức chế IRAK4 có tác dụng điều trị ở các bệnh này. Ví dụ về đau bao gồm tăng cảm đau, loạn cảm đau, đau tiền kinh nguyệt, đau có liên quan đến lạc nội mạc tử cung, đau sau phẫu thuật, viêm bàng quang kẽ, hội chứng đau từng vùng phức tạp (CRPS - complex regional pain syndrome), đau dây thần kinh sinh ba, viêm tiền liệt tuyến, đau do thương tổn tủy sống, đau do viêm, đau thắt lưng, đau do ung thư, đau có liên quan đến hóa trị liệu, bệnh thần kinh do điều trị HIV, đau do bỏng và đau mạn tính (Wolf, Livshits, et al., *Brain, Behavior, and Immunity*, 2008; Kim, Lee, et al., *Toll-like Receptors: Roles in Infection and Neuropathology*, 2009; del Rey, Apkarian, et al., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012; Guerrero, Cunha, et al., *European Journal of Pharmacology*, 2012; Kwok, Hutchinson, et al., *PLoS ONE*, 2012; Nicotra, Loram, et al., *Experimental Neurology*, 2012; Chopra and Cooper, *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013; David, Ratnayake, et al., *Neurobiology of Disease*, 2013; Han, Zhao, et al., *Neuroscience*, 2013; Liu and Ji, *Pflugers Arch.*, 2013; Stokes, Cheung, et al., *Journal of Neuroinflammation*, 2013; Zhao, Zhang, et al., *Neuroscience*, 2013; Liu, Zhang, et al., *Cell Research*, 2014; Park, Stokes, et al., *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014; Van der Watt, Wilkinson, et

al., BMC Infect Dis, 2014; Won, K. A., M. J. Kim, et al., J Pain, 2014; Min, Ahmad, et al., Photochem Photobiol., 2015; Schrepf, Bradley, et al., Brain Behav Immun, 2015; Wong, L., J. D. Done, et al., Prostate, 2015).

Quan điểm này cũng áp dụng cho một số rối loạn ung thư. Cụ thể là u lympho, ví dụ lympho tế bào B lớn lan toả (ABC-DLBCL - activated B-cell diffuse large-cell B-cell lymphoma), u lymphom tế bào vỏ và bệnh Waldenström, và cả bệnh bạch cầu lympho mạn tính, u hắc tố, u tụy và carxinom tế bào gan, đặc trưng bởi các đột biến trong MyD88 hoặc các thay đổi trong hoạt tính MyD88 mà có thể điều trị được bằng chất ức chế IRAK4 (Ngo, Young, et al., Nature, 2011; Puente, Pinyol, et al., Nature, 2011; Ochi, Nguyen, et al., J Exp Med, 2012; Srivastava, Geng, et al., Cancer Research, 2012; Treon, Xu, et al., New England Journal of Medicine, 2012; Choi, Kim, et al., Human Pathology, 2013; (Liang, Chen, et al., Clinical Cancer Research, 2013). Ngoài ra, MyD88 đóng vai trò quan trọng trong các khối u phụ thuộc ras, và như vậy các chất ức chế IRAK4 cũng thích hợp để điều trị các khối u này (Kfoury, A., K. L. Corf, et al., Journal of the National Cancer Institute, 2013). Cũng có thể có hiệu quả điều trị bệnh ung thư vú, carxinom buồng trứng, carxinom đại trực tràng, carxinom đầu và cổ, ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt thông qua việc ức chế IRAK4, vì các bệnh đã nêu có liên quan đến đường truyền tín hiệu này (Szczepanski, Czystowska, et al., Cancer Res, 2009; Zhang, He, et al., Mol Biol Rep, 2009; Wang, Qian, et al., Br J Cancer Kim, 2010; Jo, et al., World J Surg Oncol, 2012; Zhao, Zhang, et al.; Front Immunol, 2014; Chen, Zhao, et al., Int J Clin Exp Pathol, 2015).

Các rối loạn viêm như các hội chứng định kì liên quan đến cryopyrin (CAPS - cryopyrin-associated periodic syndromes) bao gồm cả hội chứng tự viêm do lạnh mang tính gia đình (FCAS - familial cold autoinflammatory syndrome), hội chứng MWS (Muckle-Wells syndrome), bệnh viêm đa hệ thống khởi phát ở trẻ sơ sinh (NOMID - neonatal-onset multisystem inflammatory disease) và hội chứng thần kinh, da và khớp mãn tính ở trẻ em (CONCA - chronic infantile, neurological, cutaneous, and articular); sốt địa trung hải mang tính gia đình (FMF - familial mediterranean fever), hội chứng tăng IgD (HIDS - hyper-IgD syndrome), hội chứng định kỳ liên quan đến thụ thể yếu tố hoại tử khối u 1 (TRAPS - tumour necrosis factor receptor 1-associated periodic syndrom), viêm khớp tự phát thiếu niên, bệnh Still khởi phát ở người lớn, bệnh

Adamantiades-Behçet, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm kết giác mạc khô, hội chứng PAPA (viêm khớp sinh mủ, viêm da mủ hoại thư và trứng cá), hội chứng Schnitzler và hội chứng Sjögren được điều trị bằng cách phong bế đường tín hiệu IL-1; do đó ở đây, chất ức chế IRAK4 cũng thích hợp để điều trị các bệnh đã nêu (Narayanan, Corrales, et al., Cornea, 2008; Brenner, Ruzicka, et al., British Journal of Dermatology, 2009; Henderson and Goldbach-Mansky, Clinical Immunology, 2010; Dinarello, European Journal of Immunology, 2011; Gul, Tugal-Tutkun, et al., Ann Rheum Dis, 2012; Pettersson, Annals of Medicine, 2012; Ruperto, Brunner, et al., New England Journal of Medicine, 2012; Nordström, Knight, et al., The Journal of Rheumatology, 2012; Vijmasi, Chen, et al., Mol Vis, 2013; Yamada, Arakaki, et al., Opinion on Therapeutic Targets, 2013; de Koning, Clin Transl Allergy, 2014). Phổi từ của IL-33R, IL-33, đặc biệt có liên quan đến sinh bệnh học của bệnh suy thận cấp, và do đó việc ức chế IRAK4 để phòng ngừa và/hoặc điều trị là cách điều trị thích hợp (Akçay, Nguyen, et al., Journal of the American Society of Nephrology, 2011). Các thành phần của họ thụ thể IL-1 có liên quan đến nhồi máu cơ tim, các rối loạn khác nhau ở phổi như hen, COPD, viêm phổi mô kẽ vô căn, viêm mũi dị ứng, xơ hóa phổi và hội chứng suy hô hấp cấp (acute respiratory distress syndrome - ARDS), và do đó tác dụng phòng ngừa và/hoặc điều trị có thể được mong đợi đối với các bệnh đã nêu nhờ việc ức chế IRAK4 (Kang, Homer, et al., The Journal of Immunology, 2007; Imaoka, Hoshino, et al., European Respiratory Journal, 2008; Couillin, Vasseur, et al., The Journal of Immunology, 2009; Abbate, Kontos, et al., The American Journal of Cardiology, 2010; Lloyd, Current Opinion in Immunology, 2010; Pauwels, Bracke, et al., European Respiratory Journal, 2011; Haenueken, Matsushita, et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012; Yin, Li, et al., Clinical & Experimental Immunology, 2012; Abbate, Van Tassell, et al., The American Journal of Cardiology, 2013; Alexander-Brett, et al., The Journal of Clinical Investigation, 2013; Bunting, Shadie, et al., BioMed Research International, 2013; Byers, Alexander-Brett, et al., The Journal of Clinical Investigation, 2013; Kawayama, Okamoto, et al., J Interferon Cytokine Res, 2013; Martínez-González, Roca, et al., American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2013; Nakanishi, Yamaguchi, et al., PLoS ONE, 2013; Qiu, Li, et al., Immunology, 2013; Li, Guabiraba, et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014; Saluja, Ketelaar,

et al., Molecular Immunology, 2014; Lugrin, Parapanov, et al., The Journal of Immunology, 2015).

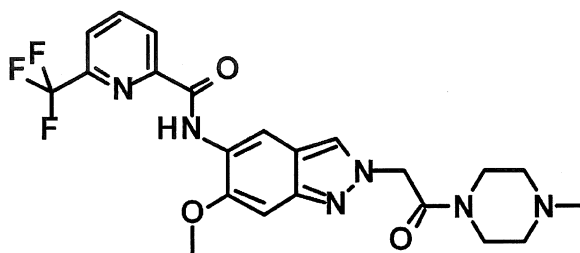
Giải pháp kỹ thuật đã biết bộc lộ nhiều loại chất ức chế IRAK4 khác nhau (xem, ví dụ, Annual Reports in Medicinal Chemistry (2014), 49, 117 – 133).

US8293923 và US20130274241 bộc lộ các chất ức chế IRAK4 có cấu trúc indazol được thế ở vị trí số 3. Không có tài liệu nào mô tả về các indazol được thế ở vị trí số 2.

WO2013106254 và WO2011153588 bộc lộ các dẫn xuất indazol được thế hai lần ở vị trí 2, 3.

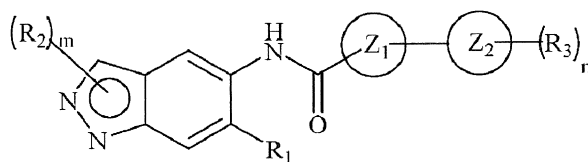
WO2007091107 mô tả các dẫn xuất indazol được thế ở vị trí số 2 để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. Các hợp chất được bộc lộ không có nhóm thế 6-hydroxyalkyl.

WO2015091426 mô tả các indazol, như hợp chất ví dụ 64, được thế ở vị trí số 2 bằng chuỗi bên carboxamit.



Hợp chất ví dụ 64

WO2015104662 bộc lộ các hợp chất indazol được thế ở vị trí số 2 có công thức chung sau:



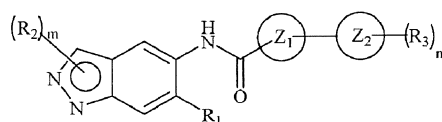
trong đó R_2 là nhóm alkyl hoặc xycloalkyl. Không có mô tả rõ ràng về các hợp chất indazol được thế ở vị trí số 2 có nhóm methyl, 2-metoxetyl và xyclopentyl ở vị trí số 2 (Ví dụ 1, 4 và 76). Ví dụ 117 cũng mô tả dẫn xuất indazol có phần tử thế hydroxyetyl ở vị trí số 1. Tuy nhiên, không dẫn xuất indazol nào có phần tử thế 3-hydroxy-3-metylbutyl ở vị trí số 1 hoặc vị trí số 2 được mô tả.

Các hợp chất indazol có nhóm alkyl được thế hydroxyl ở vị trí số 2 nhìn chung được bao gồm trong công thức chung, nhưng không được bộc lộ rõ ràng trong WO2015104662.

Các hợp chất indazol có nhóm alkyl ở vị trí số 2 trong đó nhóm alkyl được thế tiếp bằng nhóm metylsulphonyl không nằm trong công thức chung và các định nghĩa về các phần tử thế R_2 trong WO2015104662.

Ngoài cách thế trên indazol ở vị trí 1 và 2 được mô tả trên đây, WO2015104662 mô tả các hợp chất indazol có phép thế ở vị trí số 6 trong đó R_1 được xác định như sau: alkyl, xyano, $-NR_aR_b$ hoặc các nhóm tùy ý được thế được chọn từ xycloalkyl, aryl hoặc heteroxyclyl, trong đó các phần tử thế độc lập là alkyl, alkoxy, halogen, hydroxyl, hydroxyalkyl, amino, aminoalkyl, nitro, xyano, haloalkyl, haloalkoxy, $-OCOCH_2-O$ -alkyl, $-OP(O)(O-alkyl)_2$ hoặc $-CH_2-OP(O)(O-alkyl)_2$. Đối với các hợp chất imidazol trong đó R_1 là nhóm alkyl, ngày nộp đơn chính thức là ngày 7 tháng 1 năm 2015 (ngày nộp đơn quốc tế của WO2015104662). Các đơn Ấn Độ 146/CHE/2014 và 3018/CHE/2014 mà đơn này xin hưởng quyền ưu tiên không bộc lộ hợp chất indazol bất kỳ nào trong đó R_1 là nhóm alkyl.

Do đó, các hợp chất indazol có công thức chung sau:



trong đó R_1 là nhóm alkyl tùy ý được thế được mô tả lần đầu tiên vào ngày 7 tháng 1 năm 2015 và do đó sau ngày ưu tiên của đơn hiện tại.

Ví dụ về các phần tử thế ở vị trí số 6 được mô tả trong WO2015104662 đối với R_1 là xyclopropyl, xyclohexyl, xyano, 3-flophenyl và các phần tử thế dị vòng no. Các indazol có nhóm alkyl được thế hydroxyl ở vị trí số 6 không được mô tả rõ ràng trong tài liệu WO2015104662.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

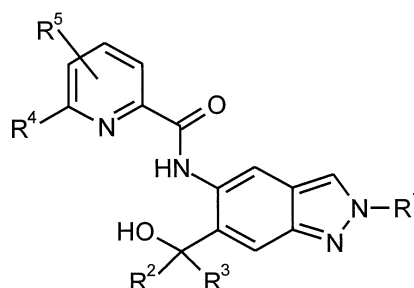
Vấn đề mà sáng chế hướng đến là cung cấp các hợp chất mới mà hoạt động dưới dạng chất ức chế kinaza-4 có liên quan đến thụ thể interleukin-1 (IRAK4).

Các chất ức chế IRAK4 mới đặc biệt thích hợp để điều trị và ngăn ngừa các rối loạn tăng sinh, rối loạn chuyển hóa và rối loạn viêm đặc trưng bởi hệ miễn dịch phản ứng quá mức. Các rối loạn cụ thể có thể được kể ra ở đây là các rối loạn viêm da, các rối loạn tim mạch, các rối loạn về phổi, các rối loạn về mắt, các rối loạn thần kinh, các rối loạn đau và ung thư.

Ngoài ra, các chất ức chế IRAK4 mới là đặc biệt thích hợp để điều trị và ngăn ngừa

- các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm, đặc biệt là viêm khớp dạng thấp, đa xơ cứng, lupus ban đỏ hệ thống, viêm cột sống dính khớp và gút,
- các rối loạn chuyển hóa, đặc biệt là các rối loạn ở gan như gan nhiễm mỡ, và
- các rối loạn phụ khoa, đặc biệt là lạc nội mạc tử cung và đau có liên quan đến lạc nội mạc tử cung và các triệu chứng có liên quan đến lạc nội mạc tử cung khác như đau bụng kinh, đau giao hợp, tiểu buốt và đau khi đại tiện.

Sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức chung (I)



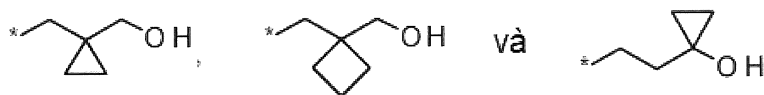
(I)

trong đó:

R¹ là C₁-C₆-alkyl, trong đó nhóm C₁-C₆-alkyl không được thể hoặc được thể một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng

halogen, hydroxyl, C₃-C₆-xycloalkyl không được thể hoặc được thể một lần hoặc nhiều lần bằng halogen, hoặc nhóm R⁶, R⁷SO₂, R⁷SO hoặc R⁸O,

hoặc nhóm được chọn từ:



trong đó * là vị trí gắn kết của nhóm với phần còn lại của phân tử;

R^2 và R^3 luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc C_1 - C_6 -alkyl;

R^4 là halogen, xyano, C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần, giống nhau hoặc khác nhau hoặc C_3 - C_6 -xycloalkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần, giống nhau hoặc khác nhau, và các phân tử thế được chọn từ nhóm gồm halogen và hydroxyl;

R^5 là hydro, halogen hoặc C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần bằng halogen;

R^6 là dị vòng no một vòng không được thế hoặc được thế một hoặc hai lần bằng metyl, có 4 đến 6 nguyên tử trong vòng, mà chứa nguyên tử khác loại hoặc nhóm khác loại từ nhóm gồm O, S, SO và SO_2 ;

R^7 là C_1 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen, hydroxyl hoặc C_3 - C_6 -xycloalkyl,

hoặc R^7 là C_3 - C_6 -xycloalkyl;

R^8 là C_1 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Khả năng ức chế IL-23 trong các tế bào DC do bạch cầu đơn nhân người tạo ra của hợp chất ví dụ 12. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình với độ lệch chuẩn.

Fig. 2: Khả năng ức chế INF- α trong các tế bào DC tương bào người được kích thích bởi (A) imiquimod (R837) hoặc (B) CpG-A của hợp chất ví dụ 12. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình với độ lệch chuẩn.

Fig. 3: Điều trị viêm do LPS gây ra bằng hợp chất ví dụ 11 dẫn đến lượng TNF- α tiết ra giảm. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình với độ lệch chuẩn.

Fig. 4: Điều trị viêm do IL-1 β gây ra bằng hợp chất ví dụ 11 (trái) và 12 (phải) dẫn đến lượng TNF- α tiết ra giảm theo cách phụ thuộc liều. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình với độ lệch chuẩn.

Fig. 5: Tác dụng kháng viêm của hợp chất ví dụ 11 trong mô hình động vật mắc viêm khớp dạng thấp (mô hình chuột cống mắc viêm khớp dạng thấp do tá dược gây ra). Ước chế đáng kể và theo cách phụ thuộc liều bệnh viêm khớp dạng thấp đo được dựa trên điểm hoạt động của bệnh. Dữ liệu tương ứng với giá trị trung bình + độ lệch chuẩn. Phép phân tích phương sai ANOVA một nhân tố với sau đó là phân tích nhiều so sánh với nhóm đối chứng CFA bằng kiểm định Dunnett; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Fig. 6: Tác dụng kháng viêm của hợp chất ví dụ 12 trong mô hình động vật mắc viêm khớp dạng thấp (mô hình chuột nhắt mắc viêm khớp dạng thấp do kháng thể collagen gây ra). Ước chế đáng kể và theo cách phụ thuộc liều bệnh viêm khớp dạng thấp đo được dựa trên điểm hoạt động của bệnh. Dữ liệu tương ứng với giá trị trung bình + độ lệch chuẩn. Ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng kháng thể collagen (AK) và các nhóm điều trị được tính toán bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA một nhân tố với sau đó là phân tích nhiều so sánh (kiểm định Dunnett) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong trường hợp tổng hợp các hợp chất trung gian và ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả dưới đây, một hợp chất bất kỳ được đưa ra ở dạng muối của bazơ hoặc axit tương ứng thường là muối với thành phần tỷ lệ chính xác thu được theo quy trình điều chế và/hoặc tinh chế tương ứng chưa biết. Trừ khi được xác định một cách chi tiết hơn, các phần bổ sung vào tên và công thức cấu trúc, như “hydroclorua”, “trifloaxetat”, “muối natri” hoặc “x HCl”, “x CF₃COOH”, “x Na⁺” không nên được hiểu về ý nghĩa tỷ lệ trong trường hợp các muối như vậy, mà chỉ là ký hiệu mô tả về các thành phần tạo muối có mặt trong đó.

Điều này áp dụng một cách tương ứng nếu các hợp chất trung gian tổng hợp hoặc ví dụ thực hiện sáng chế hoặc các muối của chúng thu được ở dạng solvat, ví dụ hydrat, có thành phần tỷ lệ chưa biết (nếu chúng có dạng xác định) bằng quy trình điều chế và/hoặc tinh chế được mô tả.

Các hợp chất theo sáng chế là các hợp chất có công thức (I) và các muối, solvat và solvat của các muối của chúng, các hợp chất mà được bao hàm trong công thức (I) và có công thức được đề cập dưới đây và các muối, solvat và solvat của muối của chúng và các hợp chất được bao hàm trong công thức (I) và được đề cập dưới đây dưới dạng các phương án và các muối, solvat và solvat của các muối của chúng, nếu các hợp chất được bao hàm trong công thức (I) và được đề cập dưới đây không phải là muối, solvat và solvat của các muối.

Các muối được ưu tiên trong ngữ cảnh của sáng chế là muối chấp nhận được về mặt sinh lý của hợp chất theo sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế cũng bao gồm các muối mà bản thân chúng không thích hợp cho các ứng dụng được phẩm nhưng có thể được sử dụng, ví dụ, để tách hoặc tinh chế hợp chất theo sáng chế.

Muối chấp nhận được về mặt sinh lý của hợp chất theo sáng chế bao gồm muối cộng axit của axit vô cơ, axit cacboxylic và axit sulphonic, ví dụ muối của axit clohydric, axit bromhydric, axit sulphuric, axit phosphoric, axit metansulphonic, axit etansulphonic, axit toluensulphonic, axit benzensulphonic, axit naphthalendisulphonic, axit axetic, axit trifloaxetic, axit propionic, axit lactic, axit tartaric, axit malic, axit citric, axit fumaric, axit maleic và axit benzoic.

Muối chấp nhận được về mặt sinh lý của hợp chất theo sáng chế cũng bao gồm các muối của kiềm thông thường, theo cách ví dụ và tốt hơn là muối của kim loại kiềm (ví dụ, các muối natri và kali), muối của kim loại kiềm thổ (ví dụ, các muối canxi và magie) và muối amoni dẫn xuất từ amoniac hoặc các amin hữu cơ có từ 1 đến 16 nguyên tử cacbon, theo cách ví dụ và tốt hơn là etylamin, diethylamin, triethylamin, etyldiisopropylamin, monoetanolamin, dietanolamin, trietanolamin, dicyclohexylamin, dimethylaminoethanol, procain, dibenzylamin, N-metylmorpholin, arginin, lysin, etylenediamin, và N-metylpiperidin.

Solvat trong ngữ cảnh theo sáng chế được mô tả là các dạng của hợp chất theo sáng chế mà dạng này tạo phức ở trạng thái rắn hoặc lỏng bằng cách phối trí với các

phân tử dung môi. Hydrat là dạng đặc biệt của solvat trong đó sự phối trí là phối trí với nước.

Hợp chất theo sáng chế có thể, tùy thuộc vào cấu trúc của chúng, tồn tại ở các dạng đồng phân lập thể khác nhau, tức là ở dạng các chất đồng phân cấu hình hoặc theo cách khác, nếu thích hợp, ở dạng chất đồng phân cấu dạng (chất đồng phân đối ảnh và/hoặc chất đồng phân không đối quang, bao gồm các chất đồng phân trong trường hợp chất đồng phân atrop). Do đó, sáng chế bao hàm các chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang, và hỗn hợp tương ứng của chúng. Các cấu tử đồng nhất về mặt đồng phân lập thể có thể được tách ra khỏi các hỗn hợp của các chất đồng phân đối ảnh và/hoặc các chất đồng phân không đối quang theo cách đã biết; các quy trình sắc ký được ưu tiên sử dụng cho mục đích này, đặc biệt là phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) trên pha đối xứng và không đối xứng.

Trường hợp hợp chất theo sáng chế có thể xuất hiện ở dạng hỗn biến, sáng chế bao gồm tất cả các dạng hỗn biến.

Sáng chế cũng bao gồm tất cả các biến thể đồng vị thích hợp của hợp chất theo sáng chế. Biến thể đồng vị của hợp chất theo sáng chế được hiểu ở đây có nghĩa là hợp chất, trong đó ít nhất một nguyên tử bên trong hợp chất theo sáng chế đã được chuyển đổi cho nguyên tử khác có cùng số nguyên tử, nhưng có khối lượng nguyên tử khác so với khối lượng nguyên tử mà thông thường hoặc chủ yếu xuất hiện trong tự nhiên. Ví dụ về các chất đồng vị mà có thể kết hợp được vào hợp chất theo sáng chế là các chất đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, lưu huỳnh, flo, clo, brom và iot, như 2H (đơ-tê-ri), 3H (triti), ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{129}I và ^{131}I . Các biến thể đồng vị cụ thể của hợp chất theo sáng chế, như cụ thể là các biến thể đồng vị trong đó một hoặc nhiều chất đồng vị phóng xạ đã được kết hợp, có thể có lợi, ví dụ, trong việc khảo sát về cơ chế tác động hoặc về sự phân bố thành phần hoạt tính trong cơ thể; nhờ khả năng điều chế và khả năng phát hiện tương đối dễ, cụ thể là các hợp chất đánh dấu bằng các chất đồng vị ^3H hoặc ^{14}C rất thích hợp cho mục đích này. Ngoài ra, việc kết hợp các chất đồng vị, ví dụ đơteri, có thể dẫn đến các lợi ích điều trị đặc biệt nhờ độ ổn định chuyển hóa cao hơn của hợp chất, ví dụ kéo dài thời gian bán hủy trong cơ thể hoặc giảm liều hoạt tính cần thiết; do đó trong

một số trường hợp, những thay đổi như vậy của hợp chất theo sáng chế cũng có thể cấu thành phương án ưu tiên của sáng chế. Các biến thể đồng vị của hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế theo các quy trình đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực, ví dụ theo các phương pháp được mô tả tiếp dưới đây và các phương thức được mô tả trong phần ví dụ điều chế, bằng cách sử dụng các thay đổi đồng vị tương ứng của các chất phản ứng riêng biệt và/hoặc các hợp chất khởi đầu riêng biệt.

Sáng chế còn đề cập đến tất cả các dạng tinh thể và dạng đa hình có thể có của hợp chất theo sáng chế, trong đó dạng đa hình có thể là dạng đa hình đơn hoặc hỗn hợp của nhiều dạng đa hình trong mọi phạm vi nồng độ.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, trừ khi được chỉ định theo cách khác, các phần tử thể có ý nghĩa như sau:

Alkyl trong ngữ cảnh của sáng chế là nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có số nguyên tử cacbon xác định cụ thể. Ví dụ bao gồm metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, 1-metylpropyl, 2-metylpropyl, tert-butyl, n-pentyl, 1-etylpropyl, 1-metylbutyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, 2,2-dimetylpropyl, n-hexyl, 1-metylpentyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 1-etylbutyl và 2-etylbutyl. Ưu tiên metyl, etyl, n-propyl, n-butyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl và 2,2-dimetylpropyl.

Xycloalkyl trong ngữ cảnh của sáng chế là nhóm alkyl no một vòng có số nguyên tử cacbon cụ thể trong mỗi trường hợp. Các ví dụ được ưu tiên bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl và xyclohexyl.

Alkoxy trong ngữ cảnh của sáng chế là nhóm alkoxy mạch thẳng hoặc mạch nhánh có số nguyên tử cacbon xác định cụ thể. Tốt hơn là có 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ bao gồm metoxy, etoxy, n-propoxy, isopropoxy, 1-metylpropoxy, n-butoxy, isobutoxy, tert-butoxy, n-pentoxo, isopentoxo, 1-etylpropoxy, 1-metylbutoxy, 2-metylbutoxy, 3-metylbutoxy và n-hexoxy. Đặc biệt ưu tiên nhóm alkoxy mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Các ví dụ có thể được kể đến ở dạng ưu tiên là metoxy, etoxy, n-propoxy, 1-metylpropoxy, n-butoxy và isobutoxy.

Halogen trong ngữ cảnh của sáng chế flo, clo và brom. Tốt hơn là flo.

Hydroxyl trong ngữ cảnh của sáng chế là OH.

Dị vòng no một vòng là dị vòng no một vòng có 4 đến 6 nguyên tử trong vòng và chứa một nguyên tử khác loại hoặc một nhóm khác loại từ nhóm gồm O, S, SO và SO₂. Ưu tiên dị vòng có một nguyên tử khác loại hoặc một nhóm khác loại từ nhóm gồm O, SO và SO₂. Ví dụ bao gồm: oxetan, tetrahydrofuran, tetrahydro-2H-pyran-4-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-3-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-2-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-4-yl, 1,1-dioxidotetrahydrothiophen-3-yl, 1,1-dioxidotetrahydrothiophen-2-yl, 1,1-dioxidothietan-2-yl hoặc 1,1-dioxidothietan-3-yl. Ở đây đặc biệt ưu tiên oxetan và tetrahydrofuran. Rất đặc biệt ưu tiên oxetan-3-yl.

Ký hiệu * ở liên kết chỉ vị trí liên kết trong phân tử.

Khi các nhóm trong hợp chất theo sáng chế được thế, các nhóm này có thể được thế một hoặc nhiều lần, trừ khi được chỉ định khác. Trong ngữ cảnh của sáng chế, tất cả các nhóm mà xuất hiện nhiều hơn một lần được xác định một cách độc lập với nhau. Việc thế bởi một, hai hoặc ba phần tử thế giống nhau hoặc khác nhau là được ưu tiên.

Một phương án ưu tiên của R¹ là nhóm C₂-C₆-alkyl được thế bằng 1, 2 hoặc 3 nguyên tử flo. Đặc biệt ưu tiên 2,2,2-trifloetyl, 3,3,3-triflopropyl và 4,4,4-triflobutyl. Rất đặc biệt ưu tiên nhóm 4,4,4-triflobutyl.

Một phương án ưu tiên khác của R¹ là nhóm C₂-C₆-alkyl được thế bằng một hoặc hai nhóm hydroxyl hoặc một nhóm C₁-C₃-alkoxy hoặc C₁-C₃-alkoxy được thế ba lần bằng flo. Đặc biệt ưu tiên nhóm C₂-C₅-alkyl được thế bằng hydroxyl hoặc C₁-C₃-alkoxy hoặc triflometoxy hoặc 2,2,2-trifloetoxy. Rất đặc biệt ưu tiên 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-metoxypentyl, 3-hydroxypentyl, 3-triflometoxypentyl, 2-metoxetyl hoặc 2-hydroxetyl. Đặc biệt ưu tiên nhóm 3-hydroxy-3-metylbutyl.

Tốt hơn nữa nếu R¹ là nhóm C₂-C₆-alkyl được thế bằng nhóm C₁-C₆-alkyl-SO₂. Đặc biệt ưu tiên nhóm C₂-C₄-alkyl được thế methyl-SO₂. Đặc biệt ưu tiên nếu R¹ là 2-(methylsulphonyl)ethyl hoặc 3-(methylsulphonyl)propyl. Trong nhóm sau này, đặc biệt ưu tiên 2-(methylsulphonyl)ethyl.

Cũng tốt hơn nếu R¹ là nhóm C₁-C₃-alkyl được thế bằng oxetanyl, tetrahydrofuranyl, tetrahydro-2H-pyran-4-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-3-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-2-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-4-yl, 1,1-dioxidotetrahydrothiophen-3-yl, 1,1-dioxidotetrahydrothiophen-2-yl, 1,1-

dioxidothietan-2-yl hoặc 1,1-dioxidothietan-3-yl. Đặc biệt ưu tiên nhóm C₁-C₃-alkyl được thế bằng nhóm oxetan. Đặc biệt ưu tiên nếu R¹ là nhóm oxetan-3-ylmetyl.

Đối với R² và R³, mà luôn được xác định giống nhau, ưu tiên hydro hoặc metyl. Đặc biệt ưu tiên metyl.

Trong trường hợp R⁴, ưu tiên nhóm C₁-C₃-alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần bằng halogen hoặc nhóm C₁-C₃-alkyl được thế bằng một nhóm hydroxyl hoặc nhóm C₁-C₃-alkyl được thế bằng một nhóm hydroxyl và ba nguyên tử flo.

Đối với R⁴, đặc biệt ưu tiên các nhóm sau: metyl, etyl, triflo-C₁-C₃-alkyl, diflo-C₁-C₃-alkyl, hydroxymetyl, 1-hydroxyetyl, 2-hydroxypropan-2-yl và 2,2,2-triflo-1-hydroxyetyl. Đối với R⁴, đặc biệt ưu tiên các nhóm metyl, triflometyl và diflometyl. Ở đây đặc biệt ưu tiên nhóm triflometyl.

Một phương án ưu tiên của R⁵ là hydro, flo, clo hoặc C₁-C₃-alkyl. Tốt hơn nếu, R⁵ là hydro, flo hoặc metyl. Tốt nhất nếu, R⁵ là hydro hoặc flo.

Cũng đặc biệt ưu tiên các hợp chất trong đó R⁴ là metyl hoặc triflometyl và R⁵ là flo. Rất đặc biệt ưu tiên các hợp chất trong đó R⁴ là metyl và R⁵ là flo, trong đó R⁵ ở vị trí ortho so với R⁴.

Đối với R⁶, các phương án ưu tiên bao gồm oxetanyl, tetrahydrofuranyl, tetrahydro-2H-pyran-4-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-3-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-2-yl, 1,1-dioxidotetrahydro-2H-thiopyran-4-yl, 1,1-dioxidotetrahydrothiophen-3-yl, 1,1-dioxidotetrahydrothiophen-2-yl, 1,1-dioxidothietan-2-yl hoặc 1,1-dioxidothietan-3-yl. Ở đây đặc biệt ưu tiên oxetanyl. Rất đặc biệt ưu tiên oxetan-3-yl.

R⁷ được kết nối riêng với các nhóm chức -SO₂- và -SO-, tức là nhóm -SO₂- hoặc SO được thế R⁷. Về việc này, tốt hơn nếu R⁷ là C₁-C₄-alkyl, trong đó nhóm C₁-C₄-alkyl không được thế hoặc được thế một lần bằng hydroxyl hoặc bằng xyclopropyl hoặc được thế bằng ba nguyên tử flo. Cũng tốt hơn nếu R⁷ là nhóm xyclopropyl. Đặc biệt tốt hơn nếu R⁷ là metyl, etyl hoặc hydroxyetyl. Rất đặc biệt ưu tiên metyl đối với R⁷.

Điều này có nghĩa là, trong trường hợp nhóm C₁-C₆-alkyl được thế bằng R⁷SO₂- hoặc R⁷SO-, trong ngữ cảnh của R¹, ưu tiên C₁-C₆-alkyl được thế bằng C₁-C₆-alkyl-SO₂

hoặc C₁-C₆-alkyl-SO. Đối với R¹, ở đây đặc biệt ưu tiên metylsulphonyletyl và metylsulphonylpropyl. Ở đây rất đặc biệt ưu tiên metylsulphonyletyl.

Đối với R⁸, ưu tiên nhóm C₁-C₄-alkyl không được thế hoặc nhóm C₁-C₄-alkyl được thế ba lần bằng flo. Đặc biệt ưu tiên metyl, etyl, triflometyl hoặc 2,2,2-trifloetyl. Rất đặc biệt ưu tiên metyl, triflometyl hoặc 2,2,2-trifloetyl.

Ưu tiên các hợp chất có công thức (I) trong đó

R¹ là C₁-C₆-alkyl, trong đó nhóm C₁-C₆-alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng flo, hydroxyl hoặc nhóm R⁶, R⁷SO₂, R⁷SO hoặc R⁸O;

R² và R³ luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc C₁-C₃-alkyl;

R⁴ là halogen, xyano hoặc C₁-C₃-alkyl, trong đó nhóm C₁-C₃-alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen hoặc hydroxyl;

R⁵ là hydro, flo, clo hoặc C₁-C₃-alkyl;

R⁶ là oxetanyl hoặc tetrahydrofuranyl;

R⁷ là C₁-C₄-alkyl, trong đó nhóm C₁-C₄-alkyl không được thế hoặc được thế một lần bằng hydroxyl hoặc bằng xyclopropyl hoặc được thế bằng ba nguyên tử flo;

R⁸ là C₁-C₄-alkyl không được thế hoặc C₁-C₄-alkyl được thế ba lần bằng flo;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Cũng ưu tiên các hợp chất có công thức (I) trong đó

R¹ là C₂-C₆-alkyl, trong đó C₂-C₆-alkyl không được thế, hoặc

C₂-C₆-alkyl được thế một lần, hai lần hoặc ba lần bằng flo hoặc

C₂-C₆-alkyl được thế một lần bằng hydroxyl, R⁶, R⁷SO₂, hoặc R⁸O,

hoặc trong đó R¹ là C₁-C₃-alkyl được thế oxetanyl;

R² và R³ luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc metyl;

R⁴ là nhóm C₁-C₃-alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần bằng halogen hoặc nhóm C₁-C₃-alkyl được thế bằng một nhóm hydroxyl hoặc nhóm C₁-C₃-alkyl được thế bằng một nhóm hydroxyl và ba nguyên tử flo;

R⁵ là hydro, flo hoặc C₁-C₃-alkyl;

R⁷ là C₁-C₃-alkyl;

R⁸ là C₁-C₄-alkyl, trong đó nhóm C₁-C₄-alkyl không được thế hoặc được thế một, hai hoặc ba lần bằng flo;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Cũng đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức chung (I) trong đó

R¹ là nhóm C₂-C₅-alkyl được thế bằng hydroxyl hoặc C₁-C₃-alkoxy hoặc triflometoxy hoặc 2,2,2-trifloetoxy hoặc triflometyl hoặc

là nhóm C₂-C₄-alkyl được thế methyl-SO₂ hoặc

là nhóm C₁-C₂-alkyl được thế oxetan-3-yl;

R² và R³ luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc methyl;

R⁴ là methyl, ethyl, triflo-C₁-C₃-alkyl, diflo-C₁-C₃-alkyl, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, 2-hydroxypropan-2-yl và 2,2,2-triflo-1-hydroxyethyl và

R⁵ là hydro, flo hoặc methyl;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Rất đặc biệt ưu tiên các hợp chất trong đó:

R¹ là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-methylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-metoxypentyl, 3-hydroxypentyl, 3-hydroxy-2-methylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimethylpropyl, 3-triflometoxypentyl, 2-metoxylethyl, 2-hydroxyethyl, 2-(methylsulphonyl)ethyl hoặc 3-(methylsulphonyl)propyl;

R² và R³ đều là methyl hoặc hydro và

R⁴ là diflometyl, triflometyl hoặc methyl và

R⁵ là hydro hoặc flo;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Cũng rất đặc biệt ưu tiên các hợp chất trong đó

R¹ là 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(metylsulphonyl)etyl;

R² và R³ đều là metyl;

R⁴ là diflometyl hoặc triflometyl; và

R⁵ là hydro;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Cũng đặc biệt ưu tiên các hợp chất trong đó

R¹ là 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(metylsulphonyl)etyl;

R² và R³ đều là metyl;

R⁴ là metyl và

R⁵ là flo, trong đó R⁵ ở vị trí ortho so với R⁴;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

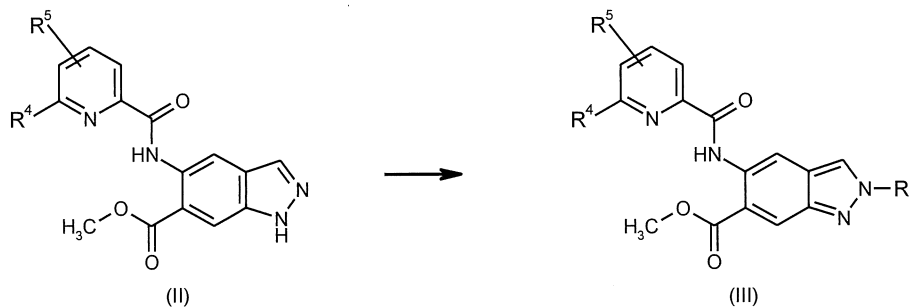
Đặc biệt, sáng chế đề xuất các hợp chất sau:

- 1) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(2-metoxetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 2) N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(2-metoxetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit

- 3) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(3-metoxypropyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 4) N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(3-metoxypropyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 5) N-[2-(2-Hydroxyetyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 6) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypropyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 7) N-[2-(2-Hydroxyetyl)-6-(hydroxymetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 8) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(oxetan-3-ylmetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 9) N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(oxetan-3-ylmetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 10) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(metylsulphonyl)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 11) N-[2-(3-Hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 12) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[2-(metylsulphonyl)etyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 13) 6-(Diflometyl)-N-[2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit
- 14) 6-(Diflometyl)-N-{6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-[2-(metylsulphonyl)etyl]-2H-indazol-5-yl}pyridin-2-carboxamit
- 15) 6-(Diflometyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypropyl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit
- 16) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit

- 17) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(triflometoxy)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 18) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(2,2,2-trifloetoxy)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 19) 5-flo-N-[2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-metylpyridin-2-carboxamit
- 20) N-[2-(3-Hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-metylpyridin-2-carboxamit
- 21) 6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit
- 22) N-{2-[2-(1-Hydroxyxyclopropyl)etyl]-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế các hợp chất có công thức chung (III) từ các hợp chất có công thức chung (II)



trong đó

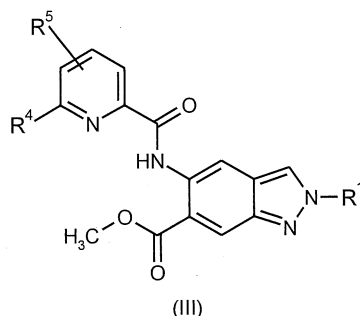
R¹ là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-metoxypopyl, 3-hydroxypropyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-triflometoxypropyl, 2-metoxetyl, 2-hydroxyetyl, 2-(metylsulphonyl)etyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(1-hydroxyxyclopropyl)etyl;

R⁴ là diflometyl, triflometyl hoặc metyl; và

R⁵ là hydro hoặc flo;

bằng phản ứng của hợp chất (II) với các alkyl halogenua được thể thích hợp hoặc các alkyl 4-metylbenzensulphonat với sự có mặt của kali cacbonat.

Sáng chế cũng đề xuất các hợp chất có công thức chung (III)



trong đó

R¹ là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-metoxypetyl, 3-hydroxypetyl, 3-hydroxybutyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-triflometoxypetyl, 2-metoxypetyl, 2-hydroxypetyl, 2-(metylsulphonyl)petyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(1-hydroxycyclopropyl)petyl;

R⁴ là diflometyl, triflometyl hoặc metyl; và

R⁵ là hydro hoặc flo;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của các hợp chất này.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức chung (III) sau đây:

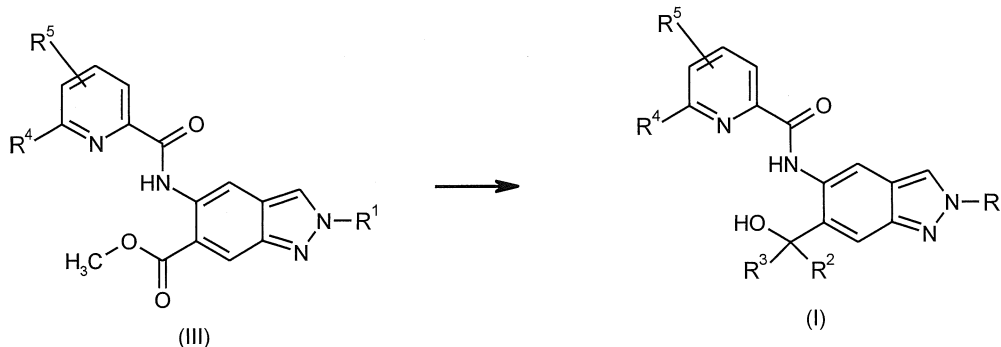
metyl 5-{[(5-flo-6-metylpyridin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat và

metyl 2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat.

Các hợp chất có công thức chung (III) thích hợp để điều chế một phần trong số các hợp chất có công thức chung (I).

Hơn nữa, các hợp chất có công thức chung (III) là chất ức chế kinaza-4 có liên quan đến thụ thể interleukin-1 (IRAK4).

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế từ các hợp chất có công thức (III)



trong đó

R^1 là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-metoxypopyl, 3-hydroxypopyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-triflometoxypopyl, 2-metoxyetyl, 2-hydroxyetyl, 3-(metylsulphonyl)propyl 2-(1-hydroxyxyclopropyl)etyl;

R^2 và R^3 là metyl;

R^4 là diflometyl, triflometyl hoặc metyl; và

R^5 là hydro hoặc flo;

bằng phản ứng Grignard với metylmagie bromua.

Các hợp chất theo sáng chế hoạt động dưới dạng chất ức chế IRAK4 kinaza và có phổ hoạt tính được lý hữu dụng không thể đoán trước được.

Do đó, ngoài đối tượng nêu trên, bản mô tả còn bộc lộ việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh ở người và động vật.

Việc điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn phụ khoa, các rối loạn viêm da, các rối loạn tim mạch, các rối loạn về phổi, các rối loạn về mắt, rối loạn tự miễn, các rối loạn đau, các rối loạn chuyển hóa, bệnh gút, các rối loạn về gan, hội chứng chuyển hóa, chứng kháng insulin và các bệnh ung thư bằng các chất ức chế IRAK4 theo sáng chế là đặc biệt được ưu tiên.

Các hợp chất theo sáng chế thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn và tình trạng liên quan đến bệnh khác nhau, đặc biệt là các rối loạn qua trung gian TLR (ngoại trừ TLR3) và/hoặc họ thụ thể IL-1 và/hoặc các rối loạn mà bệnh học của chúng trực tiếp qua trung gian IRAK4. Các rối loạn liên quan đến IRAK4 bao gồm đa xơ cứng, xơ vữa động mạch, nhồi máu cơ tim, bệnh Alzheimer, viêm cơ tim do virus, bệnh gút,

hội chứng Vogt-Koyanagi-Harada, lupus ban đỏ, bệnh vẩy nến, viêm cột sống dính khớp và bệnh viêm khớp.

Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn qua trung gian MyD88 và TLR (ngoại trừ TLR3). Các rối loạn này bao gồm đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp (đặc biệt là viêm cột sống dính khớp vẩy nến và bệnh Bekhterev), hội chứng chuyển hóa bao gồm chứng kháng insulin, bệnh đái tháo đường, viêm xương khớp, hội chứng Sjögren, viêm động mạch tế bào khổng lồ, nhiễm trùng huyết, viêm đa cơ và viêm da cơ, các rối loạn về da như bệnh vẩy nến, viêm da cơ địa, rụng tóc thành đám, trứng cá đầu đen và trứng cá thông thường, các rối loạn về phổi như xơ hóa phổi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), thương tổn phổi cấp (ALI), bệnh phổi mô kẽ (ILD), bệnh sáo phổi và tăng áp phổi.

Nhờ cơ chế hoạt động của các hợp chất theo sáng chế, các hợp chất này thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn qua trung gian TLR, bệnh Behçet, bệnh gút, lạc nội mạc tử cung và đau có liên quan đến lạc nội mạc tử cung và các triệu chứng có liên quan đến lạc nội mạc tử cung khác như đau bụng kinh, đau giao hợp, tiêu buốt và đau khi đại tiện. Ngoài ra, các hợp chất theo sáng chế thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị trong trường hợp thải loại mảnh ghép, lupus ban đỏ, bệnh Still khởi phát ở người lớn và bệnh viêm ruột mạn tính như viêm loét đại tràng và bệnh Crohn.

Ngoài các rối loạn đã liệt kê, việc sử dụng hợp chất theo sáng chế cũng thích hợp để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn sau: các rối loạn về mắt như viêm giác mạc, bệnh viêm kết mạc dị ứng, bệnh viêm kết giác mạc khô, thoái hóa điểm vàng và viêm màng mạch nhỏ; các rối loạn tim mạch như bệnh xơ cứng động mạch, tổn thương tái tưới máu cơ tim, nhồi máu cơ tim, cao huyết áp và các rối loạn về thần kinh như bệnh Alzheimer, đột quỵ và bệnh Parkinson.

Cơ chế hoạt động của các hợp chất theo sáng chế cũng giúp phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn về gan qua trung gian TLR và họ thụ thể IL-1, đặc biệt là NAFLD, NASH, ASH, xơ gan và chai gan.

Việc phòng ngừa và/hoặc điều trị chứng ngứa và đau, đặc biệt là đau cấp tính, đau mạn tính, đau do viêm và đau thần kinh, cũng đạt được nhờ các hợp chất theo sáng chế.

Nhờ cơ chế hoạt động của các hợp chất theo sáng chế, các hợp chất này thích hợp để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn ung thư như u lympho, bệnh bạch cầu lympho mạn tính, u hắc tố và carcinom tế bào gan, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt và các khối u phụ thuộc Ras.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế cũng thích hợp để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn qua trung gian họ thụ thể IL-1. Các rối loạn này bao gồm hội chứng định kỳ liên quan đến cryopyrin (CAPS - cryopyrin-associated periodic syndromes) bao gồm cả hội chứng tự viêm do lạnh mang tính gia đình (FCAS - familial cold autoinflammatory syndrome), hội chứng MWS (Muckle-Wells syndrome), bệnh viêm đa hệ thống khởi phát ở trẻ sơ sinh (NOMID - neonatal-onset multisystem inflammatory disease) và hội chứng thần kinh, da và khớp mãn tính ở trẻ em (CONCA - chronic infantile, neurological, cutaneous, and articular) syndrome, sốt địa trung hải mang tính gia đình (FMF - familial mediterranean fever), hội chứng tăng IgD (HIDS - hyper-IgD syndrome), hội chứng định kỳ liên quan đến thụ thể yếu tố hoại tử khối u 1 (TRAPS - tumour necrosis factor receptor 1-associated periodic syndrome), viêm khớp tự phát thiếu niên, bệnh Still khởi phát ở người lớn, bệnh Adamantiades-Behçet, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp, bệnh Bekhterev, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm kết giác mạc khô và hội chứng Sjögren, bệnh đa xơ cứng, bệnh lupus ban đỏ, rụng tóc thành đám, bệnh tiểu đường typ 1, bệnh tiểu đường typ 2 và di chứng của nhồi máu cơ tim. Các rối loạn về phổi như hen, COPD, viêm phổi mô kẽ vô căn và ARDS, các rối loạn phụ khoa như lạc nội mạc tử cung và đau liên quan đến lạc nội mạc tử cung và các triệu chứng liên quan đến lạc nội mạc tử cung khác như đau bụng kinh, đau giao hợp, tiểu buốt và đau khi đại tiện, bệnh viêm ruột mạn tính như bệnh Crohn và viêm loét đại tràng có liên quan đến sự mất điều hòa họ thụ thể IL-1 và thích hợp với việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để điều trị và/hoặc phòng ngừa.

Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn thần kinh qua trung gian họ thụ thể IL-1 như đột quỵ, bệnh Alzheimer, chấn thương sọ não, và các rối loạn về da như bệnh vẩy nến, viêm da cơ địa, trứng cá đầu đen, rụng tóc thành đám và viêm da tiếp xúc dị ứng.

Ngoài ra, các hợp chất theo sáng chế thích hợp để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn đau, đặc biệt là đau cấp tính, đau mạn tính, đau do viêm và đau thần kinh.

Các rối loạn này tốt hơn bao gồm tăng cảm đau, loạn cảm đau, đau do bệnh viêm khớp (như viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp và viêm cột sống dính khớp), đau tiền kinh nguyệt, đau liên quan đến lạc nội mạc tử cung, đau sau phẫu thuật, đau do viêm bàng quang kẽ, hội chứng đau từng vùng phức tạp (CRPS), đau dây thần kinh sinh ba, đau do viêm tiền liệt tuyến, đau do thương tổn tủy sống, đau do viêm, đau thắt lưng, đau do ung thư, đau có liên quan đến hóa trị, bệnh thần kinh do điều trị HIV, đau do bỏng và đau mạn tính.

Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn, đặc biệt là các rối loạn đề cập ở trên, bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu của ít nhất một trong số các hợp chất theo sáng chế.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “việc điều trị” hoặc “điều trị” bao gồm việc ức chế, làm chậm, kìm hãm, làm thuyên giảm, làm suy giảm, hạn chế, làm giảm, kiểm soát, đẩy lùi hoặc chữa lành bệnh, tình trạng bệnh lý, rối loạn, tổn thương hoặc vấn đề về sức khỏe, hoặc sự phát triển, tiến trình hoặc sự tiến triển của các tình trạng như vậy và/hoặc các triệu chứng của các tình trạng này. Ở đây, thuật ngữ “trị liệu” được hiểu là đồng nghĩa với thuật ngữ “điều trị”.

Thuật ngữ “phòng ngừa”, “dự phòng” và “ngăn ngừa” được sử dụng đồng nghĩa trong ngữ cảnh theo sáng chế và dùng để chỉ sự tránh khỏi hoặc giảm thiểu nguy cơ bị mắc phải, trải qua, chịu đựng hoặc bị bệnh, tình trạng, rối loạn, chấn thương hoặc vấn đề về sức khỏe, hoặc sự phát triển hoặc sự tiến triển của các tình trạng này và/hoặc triệu chứng của các tình trạng này.

Điều trị hoặc phòng ngừa bệnh, tình trạng, rối loạn, chấn thương hoặc vấn đề về sức khỏe có thể là một phần hoặc đầy đủ.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng đơn độc hoặc nếu cần thiết, kết hợp với các hoạt chất khác. Sáng chế cũng đề cập đến thuốc chứa ít nhất một trong số các hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều hoạt chất khác, nhất là trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn nêu trên. Ví dụ về các thành phần có hoạt tính thích hợp cho các tổ hợp bao gồm:

Thường có thể kể đến các hoạt chất như chất kháng khuẩn (ví dụ, penicillin, vancomycin, ciprofloxacin), chất kháng virus (ví dụ, aciclovir, oseltamivir) và chất

kháng nấm (ví dụ, naftifin, nystatin) và các gama globulin, các chất điều biến miễn dịch và các chất ức chế miễn dịch như cyclosporin, Methotrexat®, chất đối kháng TNF (ví dụ, Humira®, Etanercept, Infliximab), chất ức chế IL-1 (ví dụ, Anakinra, Canakinumab, Rilonacept), chất ức chế phosphodiesteraza (ví dụ, Apremilast), chất ức chế Jak/STAT (ví dụ, Tofacitinib, Baricitinib, GLPG0634), leflunomid, cyclophosphamide, rituximab, belimumab, tacrolimus, rapamycin, mycophenolate mofetil, interferons, corticosteroids (ví dụ, prednisone, prednisolone, methylprednisolone, hydrocortisone, betamethasone), cyclophosphamide, azathioprine và sulfasalazine; paracetamol, chất chống viêm không steroid (NSAIDs) (aspirin, ibuprofen, naproxen, etodolac, celecoxib, colchicine).

Cần đề cập đến các hoạt chất sau đây trong điều trị khối u: liệu pháp miễn dịch (ví dụ, aldesleukin, alemtuzumab, basiliximab, catumaxomab, celmoleukin, denileukin, diftotox, eculizumab, edrecolomab, gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, imiquimod, interferon-alpha, interferon beta, interferon-gamma, ipilimumab, lenalidomide, lenograstim, mifamurtide, ofatumumab, oprelvekin, picibanil, plerixafor, polysaccharide-K, sargramostim, sipuleucel-T, tasonermin, teceleukin, tocilizumab), các chất chống tăng sinh, ví dụ nhưng không chỉ có amsacrine, arglabin, arsenic trioxide, asparaginase, bleomycin, busulfan, dactinomycin, docetaxel, epirubicin, peplomycin, trastuzumab, rituximab, obinutuzumab, ofatumumab, tositumomab, chất ức chế aromataza (ví dụ, exemestane, fadrozole, formestane, letrozole, anastrozole, vorozole), chất kháng oestrogen (ví dụ, chlormadinone, fulvestrant, mepitiostane, tamoxifen, toremifen), các oestrogen (ví dụ, oestradiol, polyoestradiol phosphat, raloxifen), các gestagen (ví dụ, medroxyprogesterone, megestrol), chất ức chế topoisomeraza I (ví dụ, irinotecan, topotecan), chất ức chế topoisomeraza II (ví dụ, amrubicin, daunorubicin, elliptiniumacetate, etoposide, idarubicin, mitoxantrone, teniposide), chất hoạt hóa microtubuli (ví dụ, cabazitaxel, eribulin, paclitaxel, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine), chất ức chế telomeraza (ví dụ, imetelstat), các chất alkyl hóa và chất ức chế histon deacetylaza (ví dụ, bendamustine, carmustine, chlormethine, dacarbazine, estramustine, ifosfamide, lomustine, mitobronitol, mitolactol, nimustine, prednimustine, procarbazine, ranimustine, streptozotocin, temozolomide, thiotepa, treosulfan, trofosfamide, vorinostat, romidepsin, panobinostat); các chất ảnh hưởng đến các quá trình biệt hóa tế bào, như abarelix, aminoglutethimide, bexarotene, chất ức chế MMP

(các chất giả peptit, các chất giả không phải peptit và tetracyclin, ví dụ marimastat, BAY 12-9566, BMS-275291, clodronate, prinomastat, doxycycline), chất ức chế mTOR (ví dụ, sirolimus, everolimus, temsirolimus, zotarolimus), antimetabolites (ví dụ, clofarabine, doxifluridine, methotrexate, 5-fluoracil, cladribine, cytarabine, fludarabine, mercaptopurine, methotrexate, pemetrexed, raltitrexed, tegafur, tioguanine), các hợp chất platin (ví dụ, carboplatin, cisplatin, cisplatinum, eptaplatin, lobaplatin, miriplatin, nedaplatin, oxaliplatin); các hợp chất chống tạo mạch (ví dụ, bevacizumab), các hợp chất kháng androgen (ví dụ, bevacizumab, enzalutamide, flutamide, nilutamide, bicalutamide, cyproterone, cyproterone axetat), chất ức chế proteasom (ví dụ, bortezomib, carfilzomib, oprozomib, ONYX0914), chất chủ vận và chất đối kháng gonadoliberin (ví dụ, abarelix, buserelin, deslorelin, ganirelix, goserelin, histrelin, triptorelin, degarelix, leuprorelin), chất ức chế methionine aminopeptidaza (ví dụ, bengamide derivatives, TNP-470, PPI-2458), chất ức chế heparanaza (ví dụ, SST0001, PI-88); chất ức chế chống lại Ras protein biến đổi gen (ví dụ, chất ức chế farnesyl transferaza như lonafarnib, tipifarnib), chất ức chế HSP90 (ví dụ, dẫn xuất geldamycin như 17-allylaminogeldanamycin, 17-demetoxygeldanamycin (17AAG), 17-DMAG, retaspimycin hydroclorua, IPI-493, AUY922, BIIB028, STA-9090, KW-2478), chất ức chế protein cấu trúc thoi vô sắc kinesin (ví dụ, SB715992, SB743921, pentamidine/chlorpromazine), chất ức chế MEK (kinaza phosphoryl hóa protein kinaza hoạt hóa phân bào) (ví dụ, trametinib, BAY 86-9766 (refametinib), AZD6244), chất ức chế kinaza (ví dụ: sorafenib, regorafenib, lapatinib, Sutent®, dasatinib, cetuximab, BMS-908662, GSK2118436, AMG 706, erlotinib, gefitinib, imatinib, nilotinib, pazopanib, roniciclib, sunitinib, vandetanib, vemurafenib), chất ức chế đường truyền tín hiệu hedgehog (ví dụ, xyclopamine, vismodegib), chất ức chế BTK (tyrosin kina Bruton) (ví dụ, ibrutinib), chất ức chế JAK/pan-JAK (janus kinaza) (ví dụ, SB-1578, baricitinib, tofacitinib, pacritinib, momelotinib, ruxolitinib, VX-509, AZD-1480, TG-101348), chất ức chế PI3K (ví dụ, BAY 1082439, BAY 80-6946 (copanlisib), ATU-027, SF-1126, DS-7423, GSK-2126458, buparlisib, PF-4691502, BYL-719, XL-147, XL-765, idelalisib), chất ức chế SYK (tyrosin kinaza lách) (ví dụ, fostamatinib, Excellair, PRT-062607), liệu pháp gen p53, các bisphosphonat (ví dụ, etidronate, clodronate, tiludronate, pamidronate, axit alendronic, ibandronate, risedronate, zoledronate). Để kết hợp, cũng cần đề cập đến các hoạt chất sau đây làm ví dụ nhưng không chỉ có: rituximab,

xyclophosphamide, doxorubicin, doxorubicin kết hợp với oestrone, vincristine, chlorambucil, fludarabin, dexamethasone, cladribin, prednisone, ¹³¹I-chTNT, abiraterone, aclarubicin, alitretinoin, bisantrene, canxi folinate, canxi levofolinate, capecitabin, carmofur, axit clodronic, romiplostim, crisantaspase, darbepoetin alfa, decitabine, denosumab, dibrospidium clorua, eltrombopag, endostatin, epitioestanor, epoetin alfa, filgrastim, fotemustin, gallium nitrat, gemcitabine, glutoxim, histamin dihydroclorua, hydroxycarbamide, improsulfan, ixabepilone, lanreotide, lentinan, levamisole, lisuride, lonidamine, masoprocol, metyltestosterone, methoxsalen, metyl aminolevulinate, miltefosine, mitoguazone, mitomycin, mitotane, nelarabine, nimotuzumab, nitracrin, omeprazole, palifermin, panitumumab, pegaspargase, PEG epoetin beta (metoxy-PEG epoetin beta), pegfilgrastim, peg interferon alfa-2b, pentazocine, pentostatin, perfosfamide, pirarubicin, plicamycin, poliglusam, porfimer natri, pralatrexate, quinagolide, razoxane, sizofirane, sobuzoxan, natri glycididazole, tamibarotene, tổ hợp của tegafur và gimeracil và oteracil, testosterone, tetrofosmin, thalidomide, thymalfasin, trabectedin, tretinoin, trilostane, tryptophan, ubenimex, vapreotide, vi cầu thủy tinh yttrium-90, zinostatin, zinostatin stimalamer.

Tổ hợp của liệu pháp không dùng thuốc như hóa trị (ví dụ, azacitidine, belotecan, enocitabine, melphalan, valrubicin, vinflunin, zorubicin), xạ trị (ví dụ, hạt I-125, hạt paladi-103, radi-223 clorua) hoặc quang trị (ví dụ, temoporfin, talaporfin) kèm theo điều trị bằng thuốc với các chất ức chế IRAK4 theo sáng chế hoặc sau khi điều trị khối u không dùng thuốc như hóa trị, xạ trị hoặc quang trị đã kết thúc thì bổ sung điều trị bằng thuốc với các chất ức chế IRAK4 theo sáng chế cũng thích hợp để điều trị khối u.

Ngoài các chất đề cập ở trên, các chất ức chế IRAK4 theo sáng chế cũng có thể kết hợp được với các hoạt chất sau:

các hoạt chất để điều trị Alzheimer, ví dụ như chất ức chế axetylcholinesteraza (ví dụ, donepezil, rivastigmine, galantamine, tacrine), chất đối kháng thụ thể NMDA (N-metyl-D-aspartate) (ví dụ, memantine); L-DOPA/carbidopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), chất ức chế COMT (catechol-O-metyltransferaza) (ví dụ, entacapone), chất chủ vận dopamin (ví dụ, ropinrole, pramipexole, bromocriptine), chất ức chế MAO-B (monoaminoxidaza-B) (ví dụ, selegiline), chất kháng choline (ví dụ, trihexyphenidyl) và chất đối kháng NMDA (ví dụ, amantadine) để điều trị bệnh Parkinson; beta-interferon

(IFN-beta) (ví dụ, IFN beta-1b, IFN beta-1a Avonex® và Betaferon®), glatiramer axetat, globulin miễn dịch, natalizumab, fingolimod và các chất ức chế miễn dịch như mitoxantrone, azathioprine và xyclophosphamide để điều trị bệnh đa xơ cứng; chất để điều trị rối loạn về phổi ví dụ chất kích thích giao cảm beta-2 (ví dụ, salbutamol), chất kháng choline (ví dụ, glycopyrronium), methylxanthine (ví dụ, theophylline), chất đối kháng thụ thể leukotriene (ví dụ, montelukast), chất ức chế PDE-4 (phosphodiesteraza typ 4) (ví dụ, roflumilast), methotrexate, các kháng thể IgE, azathioprine và xyclophosphamide, các chế phẩm chứa cortisol; các chất để điều trị bệnh viêm xương khớp như chất chống viêm không nhân steroid (NSAIDs). Ngoài hai liệu pháp điều trị đã nêu, cần đề cập đến methotrexate và các sản phẩm sinh học trong liệu pháp điều trị bằng tế bào B và tế bào T (ví dụ, rituximab, abatacept) đối với các rối loạn dạng thấp khớp ví dụ, bệnh viêm khớp dạng thấp, viêm cột sống dính khớp và viêm khớp tự phát thiếu niên. Các chất dinh dưỡng thần kinh như chất ức chế axetylcholinesteraza (ví dụ, donepezil), chất ức chế MAO (monoaminooxidaza) (ví dụ, selegiline), các interferon và các chất chống co giật (ví dụ, gabapentin); các hoạt chất để điều trị các rối loạn tim mạch như các chất chẹn beta (ví dụ, metoprolol), chất ức chế ACE (ví dụ, benazepril), chất phong bế thụ thể angiotensin (ví dụ, losartan, valsartan), các chất lợi tiểu (ví dụ, hydrochlorothiazide), chất phong bế kênh canxi (ví dụ, nifedipine), các statin (ví dụ, simvastatin, fluvastatin); các thuốc chống tiểu đường, ví dụ metformin, các glinide (ví dụ, nateglinide), các chất ức chế DPP-4 (dipeptidyl peptidaza-4) (ví dụ, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin, vildagliptin), chất ức chế SGLT2 (yếu tố đồng vận chuyển natri/glucoza 2)/gliflozin (ví dụ, dapagliflozin, empagliflozin), các chất giả incretin (các chất tương tự/chất chủ vận hormon, peptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza (GIP) và peptid 1 giống glucagon (GLP-1)) (ví dụ, exenatide, liraglutide, lixisenatide), chất ức chế α -glucosidaza (ví dụ, acarbose, miglitol, voglibiose) và các sulphonylure (ví dụ, glibenclamide, tolbutamide), các chất tăng nhạy insulin (ví dụ, pioglitazone) và liệu pháp sử dụng insulin (ví dụ, NPH insulin, insulin lispro), các chất dùng trong điều trị hạ đường huyết, để điều trị bệnh tiểu đường và hội chứng chuyển hóa. Các thuốc làm giảm lipid, ví dụ các chất xơ (ví dụ, bezafibrate, etofibrate, fenofibrate, gemfibrozil), các dẫn xuất axit nicotinic (ví dụ, axit nicotinic/laropiprant), ezetimib, các statin (ví dụ, simvastatin, fluvastatin), các chất trao đổi anion (ví dụ, colestyramine, colestipol, colessevelam). Các hoạt chất như mesalazine, sulfasalazine, azathioprine, 6-

mercaptopurine hoặc methotrexate, nhóm lợi khuẩn (Mutaflor, VSL#3®, Lactobacillus GG, Lactobacillus plantarum, L. acidophilus, L. casei, Bifidobacterium infantis 35624, Enterococcus fecium SF68, Bifidobacterium longum, Escherichia coli Nissle 1917), nhóm kháng sinh ví dụ ciprofloxacin và metronidazole, thuốc chống tiêu chảy, ví dụ loperamide, hoặc thuốc nhuận tràng (bisacodyl) để điều trị bệnh viêm ruột mạn tính. Các chất ức chế miễn dịch như glucocorticoid và các chất chống viêm không nhân steroid (NSAIDs), cortisone, chloroquine, cyclosporine, azathioprine, belimumab, rituximab, cyclophosphamide để điều trị bệnh lupus ban đỏ. Ví dụ, nhưng không chỉ có, các chất ức chế calcineurin (ví dụ, tacrolimus và ciclosporin), chất ức chế phân chia tế bào (ví dụ, azathioprine, mycophenolate mofetil, axit mycophenolic, everolimus hoặc sirolimus), rapamycin, basiliximab, daclizumab, các kháng thể kháng CD3, globulin kháng tế bào lympho T/globulin kháng tế bào lympho trong cấy ghép cơ quan. Các chất tương tự vitamin D3, ví dụ calcipotriol, tacalcitol hoặc calcitriol, axit salicylic, ure, cyclosporine, methotrexate, efalizumab dùng trong rối loạn về da.

Cũng cần đề cập đến các thuốc chứa ít nhất một trong số các hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác, đặc biệt là chất ức chế EP4 (chất ức chế thụ thể 4 prostaglandin E2), chất ức chế P2X3 (P2X purinoceptor 3), chất ức chế PTGES (chất ức chế prostaglandin E synthase) hoặc chất ức chế AKR1C3 (chất ức chế thành viên C3 của họ aldo-keto reductase 1), để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn nêu trên.

Các hợp chất theo sáng chế có thể hoạt động hệ thống và/hoặc khu trú. Đối với mục đích này, các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng theo cách thích hợp, ví dụ theo đường uống, ngoài đường tiêu hóa, đường phổi, đường mũi, đường dưới lưỡi, đường lưỡi, đường má miệng, đường trực tràng, đường da, đường qua da, hoặc đường kết mạc, qua tai hoặc ở dạng cấy ghép hoặc sten.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng ở dạng sử dụng thích hợp với các đường dùng này.

Dạng dùng thích hợp để dùng qua đường miệng là các dạng dùng mà hoạt động theo như đã biết và giải phóng hợp chất theo sáng chế một cách nhanh chóng và/hoặc theo cách được cải biến và chứa hợp chất theo sáng chế ở dạng tinh thể và/hoặc vô định hình và/hoặc hòa tan, chẳng hạn viên nén (viên nén được bao hoặc không được bao,

chẳng hạn với lớp bao không tan hoặc tan chậm hoặc kháng dịch vị dạ dày giúp điều chỉnh mức giải phóng hợp chất theo sáng chế), viên nén hoặc màng/viên dẹt mà nó phân rã một cách nhanh chóng trong khoang miệng, màng/đông khô, viên nang (chẳng hạn viên nang gelatin cứng hoặc mềm), viên nén được bao đường, cốm, viên tròn, bột, nhũ tương, hỗn dịch, sol khí hoặc dung dịch.

Dùng theo đường ngoài tiêu hóa có thể được hoàn thành không cần bước tái hấp thu (ví dụ, theo đường tĩnh mạch, đường động mạch, đường trong tim, trong ống sống hoặc trong ống sống vùng thắt lưng) hoặc bao gồm việc tái hấp thu (ví dụ, theo đường trong cơ, theo đường dưới da, trong da, qua da hoặc trong phúc mạc). Các dạng dùng thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa gồm các chế phẩm tiêm và truyền ở dạng dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, dạng đông khô hoặc bột vô trùng.

Đối với những đường dùng khác, các ví dụ thích hợp là dạng thuốc xông (gồm máy xông hít bột, máy khí dung), chế phẩm nhỏ mũi, dung dịch hoặc chế phẩm phun mũi, viên nén, viên bao film/viên dẹt hoặc viên nang dùng theo đường lưỡi, đường dưới lưỡi hoặc đường miệng má, thuốc đạn, chế phẩm dùng cho tai hoặc mắt, viên nang âm đạo, huyền phù nước (thuốc xúc, hỗn hợp lắc), huyền phù ưa lipid, mỡ bôi, kem bôi, các hệ điều trị qua da (ví dụ miếng dán), sữa, hồ nhão, bột, bột mịn, dạng cây hoặc đặt stent.

Ưu tiên là dùng đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa, đặc biệt là dùng đường miệng.

Hợp chất theo sáng chế có thể được chuyển đổi sang các dạng sử dụng nêu trên. Việc này có thể được thực hiện theo cách đã biết, bằng cách trộn với tá dược trợ, không độc, được dụng. Các tá dược này bao gồm chất mang (ví dụ, xenluloza vi tinh thể, lactoza, manitol), dung môi (ví dụ, dung dịch polyetylen glycol), chất nhũ hóa và chất phân tán hoặc tạo ẩm (ví dụ, natri dodexylsulphat, polyoxysorbitan oleat), chất dính (ví dụ, polyvinylpyrrolidon), các polyme tổng hợp và tự nhiên (ví dụ, albumin), chất ổn định (ví dụ, chất chống oxy hóa, ví dụ axit ascorbic), chất tạo màu (ví dụ, chất màu hữu cơ, ví dụ sắt oxit) và các chất hiệu chỉnh hương và/hoặc mùi.

Sáng chế còn đề cập đến thuốc chứa ít nhất một hợp chất theo sáng chế, điển hình cùng với một hoặc nhiều tá dược trợ, không độc, được dụng và việc sử dụng thuốc nêu trên cho các mục đích nêu trên.

Nói chung, thấy rằng có lợi nếu dùng ngoài đường tiêu hóa với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1 mg/kg, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5 mg/kg, trọng lượng cơ thể để thu được hiệu quả. Trong trường hợp dùng theo đường miệng, liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100mg/kg, tốt hơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20mg/kg, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10mg/kg thể trọng.

Tuy nhiên, trong một số trường hợp, có thể cần lượng nằm ngoài khoảng nêu trên, cụ thể là tùy thuộc vào thể trọng, đường dùng, đáp ứng cá nhân với hoạt chất, bản chất của dạng bào chế và thời gian hoặc khoảng thời gian sử dụng. Do đó, trong một số trường hợp, có thể là đủ nếu sử dụng lượng ít hơn lượng tối thiểu nêu trên, trong khi ở những trường hợp khác, cần phải dùng lượng cao hơn giới hạn trên đã nêu. Trong trường hợp dùng lượng lớn hơn, tốt hơn có thể phân chia lượng này thành nhiều liều dùng trong ngày.

Các ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây nhằm mục đích minh họa sáng chế. Sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

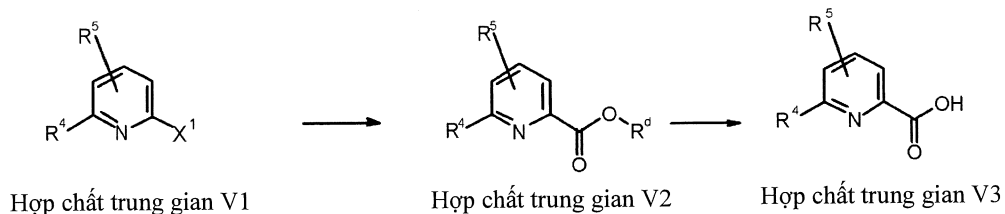
Trừ khi được chỉ dẫn khác đi, tỷ lệ % trong phần thử nghiệm và phần ví dụ dưới đây là tỷ lệ % theo khối lượng; phần là phần theo khối lượng. Các tỷ lệ dung môi, tỷ lệ pha loãng và dữ liệu nồng độ đối với chất lỏng/dung dịch lỏng trong mỗi trường hợp là dựa trên thể tích.

Điều chế các hợp chất theo sáng chế

Việc điều chế các hợp chất theo sáng chế được minh họa trong các sơ đồ tổng hợp sau.

Nguyên liệu ban đầu được sử dụng để tổng hợp các hợp chất theo sáng chế là các axit carboxylic (hợp chất trung gian V3), có bán trên thị trường hoặc có thể điều chế được bằng các phương pháp đã biết trong tài liệu hoặc tương tự như các phương pháp đã biết trong tài liệu (xem, ví dụ, European Journal of Organic Chemistry 2003, 8, 1559 – 1568, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38, 9, 2446 – 2458, Synthetic Communications 2012, 42, 658 – 666, Tetrahedron, 2004, 60, 51, 11869 - 11874) (xem, ví dụ, Sơ đồ tổng hợp 1). Một số axit carboxylic V3 có thể điều chế được từ các este carboxylic (hợp chất trung gian V2) bằng cách thủy phân (xem, ví dụ, phản ứng của ethyl 6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat với dung dịch nước natri hydroxit trong metanol,

WO2004113281) hoặc – trong trường hợp *tert*-butyl este – bằng phản ứng với axit, ví dụ axit clohydric hoặc axit trifloaxetic (xem, ví dụ, Dalton Transactions, 2014, 43, 19, 7176 – 7190). Các axit carboxylic V3 cũng có thể được sử dụng ở dạng muối kim loại kiềm của chúng. Các hợp chất trung gian V2 tùy ý cũng có thể điều chế được từ các hợp chất trung gian V1 mang clo, brom hoặc iot dưới dạng phần tử thế X¹ bằng phản ứng trong khí quyển cacbon monoxit, tùy ý trong điều kiện áp suất tăng cao, với sự có mặt của phối tử phosphin, ví dụ 1,3-bis(diphenylphosphino) propan, hợp chất paladi, ví dụ paladi(II) axetat, và bazơ, ví dụ trietylamin, có bổ sung etanol hoặc metanol trong dung môi, ví dụ dimetyl sulphoxit (về phương pháp điều chế, xem ví dụ, WO2012112743, WO 2005082866, Chemical Communications (Cambridge, England), 2003, 15, 1948 – 1949, WO200661715). Các hợp chất trung gian V1 có bán trên thị trường hoặc có thể điều chế được bằng các phương pháp đã biết trong tài liệu. Chi tiết về các phương pháp minh họa có trong WO 2012061926, European Journal of Organic Chemistry, 2002, 2, 327 – 330, Synthesis, 2004, 10, 1619 – 1624, Journal of the American Chemical Society, 2013, 135, 32, 12122 – 12134, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2014, 24, 16, 4039 – 4043, US2007185058, WO2009117421.



Sơ đồ tổng hợp 1

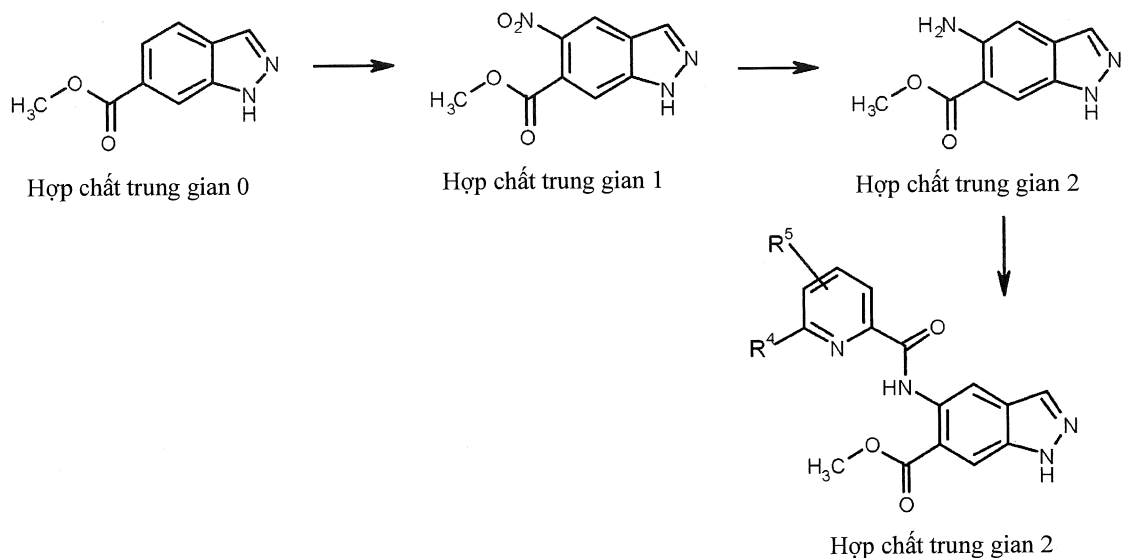
X¹ là clo, brom hoặc iot.

R^d là metyl, etyl, benzyl hoặc *tert*-butyl.

R⁴, R⁵ mỗi nhóm như được xác định trong công thức chung (I).

Metyl 5-amino-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 2) có thể thu được từ metyl 1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 0) theo Sơ đồ tổng hợp 2 bằng cách tạo nhóm nitro và khử nhóm nitro của hợp chất trung gian 1 bằng hydro với sự có mặt của paladi trên than tương tự như trong WO 2008/001883. Để điều chế các hợp chất trung gian 3 từ hợp chất trung gian 2, có thể dùng các chất phản ứng kết hợp khác nhau đã biết trong tài liệu (Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Vol.3 – Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Andrew B. Hughes, Wiley,

Chapter 12 - Peptide-Coupling Reagents, 407-442; Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 606). Ví dụ, có thể dùng 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochlorua kết hợp với 1-hydroxy-1H-benzotriazol hydrat (HOBt, WO2012107475; Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18, 2093), (1H-benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)-N,N-dimethylmethaniminium tetrafloroborat (TBTU, CAS 125700-67-6), (dimethylamino)-N,N-dimethyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)methaniminium hexaflophosphat (HATU, CAS 148893-10-1), anhydrit của axit propanphosphonic (dưới dạng dung dịch trong etyl axetat hoặc DMF, CAS68957-94-8) hoặc di-1H-imidazol-1-ylmetanon (CDI) làm chất phản ứng kết hợp, có bổ sung bazơ như triethylamin hoặc N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin trong từng trường hợp vào hỗn hợp phản ứng. Ưu tiên sử dụng TBTU và N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin trong THF.



Sơ đồ tổng hợp 2

Các phần tử thế R^4 , R^5 mỗi nhóm như được xác định trong công thức chung (I).

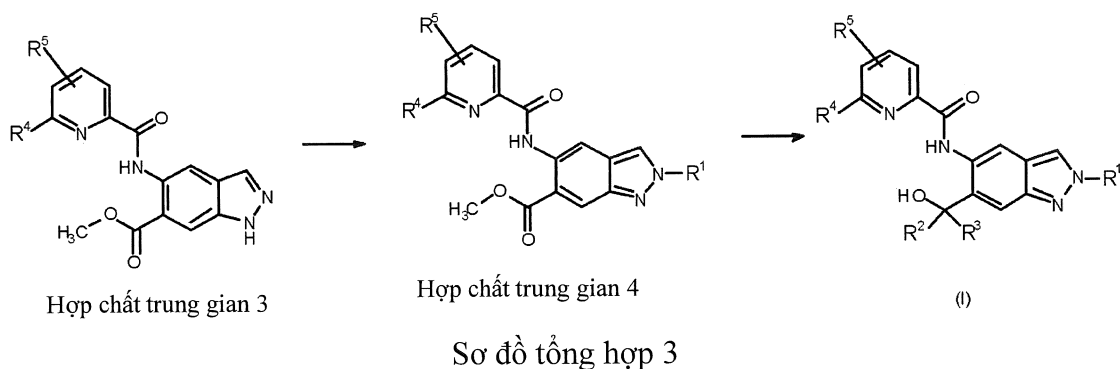
Từ các hợp chất trung gian 3, có thể điều chế các dẫn xuất indazol được thế ở vị trí số 2 (hợp chất trung gian 4) (xem sơ đồ tổng hợp 3). Các phản ứng hữu ích cho mục đích này bao gồm các phản ứng với alkyl clorua, alkyl bromua, alkyl iodua hoặc alkyl 4-metylbenzensulphonat. Các alkyl haligenua hoặc alkyl 4-metylbenzensulphonat được sử dụng có bán trên thị trường hoặc có thể điều chế được theo cách tương tự như các phương pháp đã biết trong tài liệu (để điều chế alkyl 4-metylbenzensulphonat, một ví dụ là phản ứng của rượu thích hợp với 4-metylbenzensulphonyl clorua với sự có mặt của triethylamin hoặc pyridin; xem, ví dụ, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2006,

14, 12, 4277 – 4294). Tùy ý, trong trường hợp sử dụng các alkyl clorua hoặc alkyl bromua, cũng có thể bổ sung iodua kim loại kiềm như kali iodua hoặc natri iodua. Bazo được sử dụng có thể là, ví dụ, kali cacbonat, xesi cacbonat hoặc natri hydrua. Trong trường hợp các alkyl halogenua phản ứng, trong một số trường hợp cũng có thể sử dụng N-xyclohexyl-N-metylxcyclohexanamin. Các dung môi hữu dụng bao gồm, ví dụ, 1-methylpyrrolidin-2-on, DMF, DMSO hoặc THF. Tùy ý, các alkyl halogenua hoặc alkyl 4-metylbenzensulphonat được sử dụng có thể có các nhóm chức mà tùy ý đã được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ trước đó (cũng xem P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, ISBN: 9780471697541). Ví dụ, nếu các alkyl halogenua hoặc alkyl 4-metylbenzensulphonat có một hoặc nhiều nhóm hydroxyl được sử dụng, các nhóm hydroxyl này có thể tùy ý được bảo vệ bằng nhóm *tert*-butyl(dimetyl)silyl hoặc nhóm bảo vệ chứa silic tương tự mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã quen. Theo cách khác, các nhóm hydroxyl cũng có thể được bảo vệ bằng nhóm tetrahydro-2H-pyran (THP) hoặc bằng nhóm axetyl hoặc benzoyl. Các nhóm bảo vệ được sử dụng sau đó có thể được tách ra sau khi tổng hợp hợp chất trung gian 4, hoặc sau khi tổng hợp hợp chất (I). Ví dụ, nếu nhóm *tert*-butyl(dimetylsilyl) được dùng làm nhóm bảo vệ, nhóm này có thể được tách ra bằng cách sử dụng tetrabutylamoni florua trong dung môi như THF, chẳng hạn. Nhóm bảo vệ THP có thể được tách ra, ví dụ, bằng cách sử dụng axit 4-metylbenzensulphonic (tùy ý ở dạng monohydrat). Các nhóm axetyl hoặc benzoyl có thể được tách ra bằng các xử lý bằng dung dịch nước natri hydroxit.

Tùy ý, các alkyl halogenua hoặc alkyl 4-metylbenzensulphonat được sử dụng có thể chứa các nhóm chức mà có thể chuyển đổi bằng phản ứng oxy hóa hoặc phản ứng khử mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết (xem, ví dụ, *Science of Synthesis*, Georg Thieme Verlag). Ví dụ, nếu nhóm chức là nhóm sulphua, nhóm này có thể được oxy hóa bằng các phương pháp đã biết trong tài liệu thành nhóm sulfoxit hoặc sulphon. Tương tự, trong trường hợp nhóm sulfoxit, nhóm này có thể được oxy hóa thành nhóm sulphon. Đối với các bước oxy hóa này, có thể sử dụng, ví dụ, axit 3-cloperbenzoic (CAS 937-14-4) (về việc này xem, ví dụ, US201094000 về việc oxy hóa dẫn xuất 2-(metylsulphanyl)etyl-1H-pyrazol thành dẫn xuất 2-(metylsulphinyl)etyl-1H-pyrazol và oxy hóa tiếp dẫn xuất 2-(metylsulphanyl)etyl-1H-pyrazol thành dẫn xuất 2-(metylsulphonyl)etyl-1H-pyrazol). Nếu các alkyl halogenua hoặc tosylat được sử dụng

chứa nhóm keto, các hợp chất này có thể được khử bằng các phương pháp khử mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết thành nhóm rượu (xem, ví dụ, *Chemische Berichte*, 1980, 113, 1907 – 1920 về việc sử dụng natri bohydrua). Các bước oxy hóa hoặc khử này có thể được thực hiện sau khi tổng hợp hợp chất trung gian 4, hoặc sau khi tổng hợp các hợp chất theo sáng chế có công thức chung (I). Theo cách khác, hợp chất trung gian 4 có thể điều chế được bằng phản ứng Mitsunobu (xem, ví dụ, K. C. K. Swamy et. al. *Chem. Rev.* 2009, 109, 2551 – 2651) của hợp chất trung gian 3 với các rượu alkylic tùy ý được thế. Có thể sử dụng các phosphin khác nhau như triphenylphosphin, tributylphosphin hoặc 1,2-diphenylphosphinoetan kết hợp với diisopropyl azodicarboxylat (CAS 2446-83-5) hoặc các dẫn xuất diazen khác đã nêu trong tài liệu (K. C. K. Swamy et. al. *Chem. Rev.* 2009, 109, 2551 – 2651). Ưu tiên sử dụng triphenylphosphin và diisopropyl azodicarboxylat. Nếu rượu alkylic mang nhóm chức, rượu này có thể dùng – như trong trường hợp các phản ứng nêu trên với alkyl halogenua – trong chiến lược bảo vệ đã biết (xem thêm trong P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, ISBN: 9780471697541) và sử dụng – như trong trường hợp các phản ứng nêu trên với alkyl halogenua – trong các bước oxy hóa hoặc khử cần thực hiện theo quy trình tổng hợp hợp chất trung gian 4, hoặc sau khi tổng hợp các hợp chất theo sáng chế có công thức chung (I). Từ hợp chất trung gian 4, có thể thu được các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế trong đó R^2 và R^3 được xác định là C_1 - C_6 -alkyl (trong đó R^2 và R^3 xác định như nhau) qua phản ứng Grignard (xem, ví dụ, phản ứng của dẫn xuất methyl 1H-indazol-6-carboxylat với metylmagie bromua theo EP 2489663). Đối với phản ứng Grignard, có thể dùng các alkylmagie halogenua. Đặc biệt ưu tiên metylmagie clorua hoặc metylmagie bromua trong THF hoặc dietyl ete, hoặc trong hỗn hợp THF và dietyl ete. Theo cách khác, từ hợp chất trung gian 4, có thể thu được các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế trong đó R^2 và R^3 được xác định là C_1 - C_6 -alkyl (trong đó R^2 và R^3 xác định như nhau) qua phản ứng với chất phản ứng alkyl lithi (xem, ví dụ, phản ứng của dẫn xuất methyl 2-amino-4-clo-1-metyl-1H-benzimidazol-7-carboxylat với isopropyllithi hoặc tert-butyllithi theo WO2006116412). Từ hợp chất trung gian 4, có thể điều chế các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế trong đó R^2 và R^3 được xác định là H bằng cách khử bằng lithi nhôm hydrua trong THF, lithi bohydrua trong

THF hoặc natri bohydrua trong THF, tùy ý có bổ sung metanol, hoặc hỗn hợp lithi bohydrua và natri bohydrua.



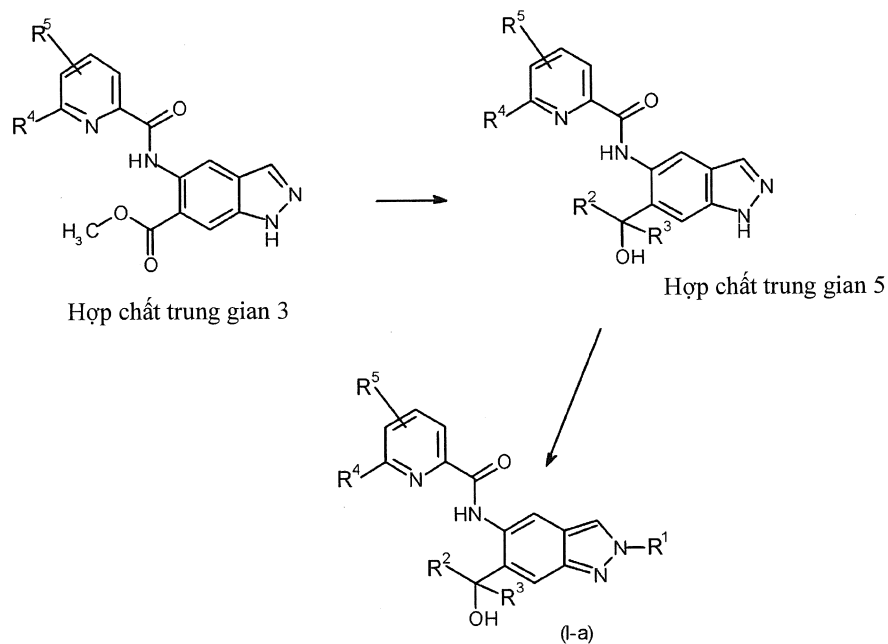
Các phần tử thế R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 mỗi nhóm như được xác định trong công thức chung (I).

Từ hợp chất trung gian 3, có thể thu được hợp chất trung gian 5 trong đó R^2 và R^3 được xác định là C_1 - C_6 -alkyl (trong đó R^2 và R^3 xác định như nhau) bằng phản ứng Grignard (xem, ví dụ, Sơ đồ tổng hợp 4). Nhằm mục đích này, có thể dùng các alkylmagie halogenua thích hợp, ví dụ metylmagie clorua hoặc metylmagie bromua trong THF hoặc trong diethyl ete hoặc trong hỗn hợp THF và diethyl ete.

Sau đó, từ hợp chất trung gian 5, có thể điều chế phần (I-a) của các hợp chất (I) theo sáng chế trong đó R^2 và R^3 được xác định là C_1 - C_6 -alkyl (trong đó R^2 và R^3 xác định như nhau). Nhằm mục đích này, tương tự như Sơ đồ tổng hợp 3 (điều chế hợp chất trung gian 3), các phản ứng hữu ích là các phản ứng của hợp chất trung gian 5 với các alkyl clorua tùy ý được thế, alkyl bromua, alkyl iodua hoặc alkyl 4-methylbenzensulphonat. Có thể sử dụng chiến lược bảo vệ tương tự với các chiến lược được mô tả trong Sơ đồ tổng hợp 3.

Theo cách khác, để điều chế phần (I-a) của các hợp chất (I) theo sáng chế trong đó R^2 và R^3 được xác định là C_1 - C_6 -alkyl (trong đó R^2 và R^3 xác định như nhau), có thể sử dụng phản ứng Mitsunobu của hợp chất trung gian 5 với các rượu alkylic tùy ý được thế (tương tự như Sơ đồ tổng hợp 3).

Nếu R^1 trong các hợp chất có công thức (I-a) chứa nhóm chức thích hợp, nhóm này sau đó có thể, tương tự như Sơ đồ tổng hợp 3, dùng trong các phản ứng oxy hóa hoặc khử để điều chế các hợp chất theo sáng chế.



Sơ đồ tổng hợp 4

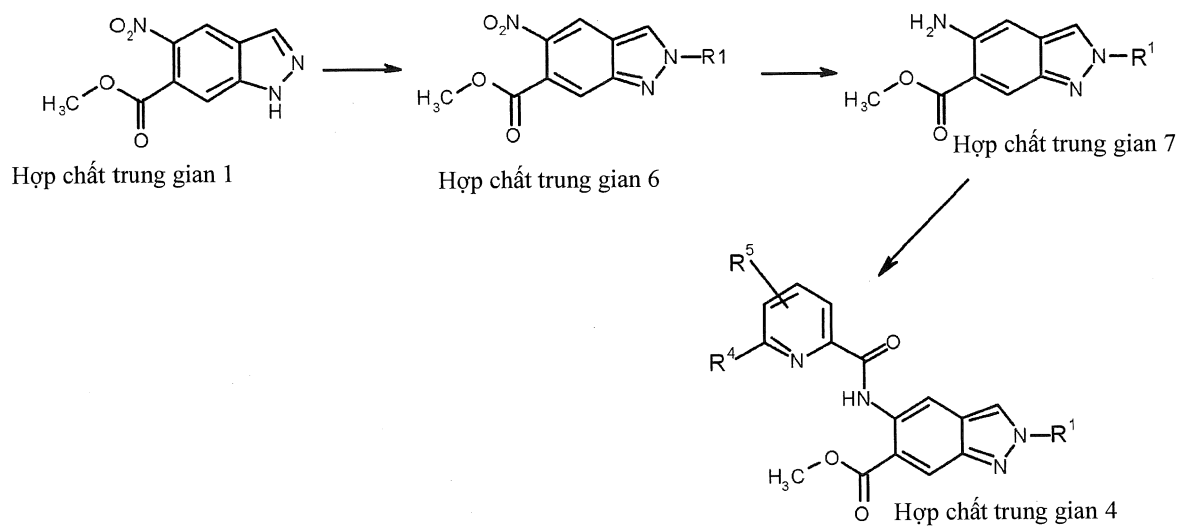
Các phần tử thế R^1 , R^4 , R^5 mỗi nhóm như được xác định trong công thức chung (I). R^2 và R^3 luôn được xác định giống nhau và đều là C_1 - C_6 -alkyl.

Từ hợp chất trung gian 1, có thể điều chế hợp chất trung gian 4 theo cách khác (xem Sơ đồ tổng hợp 5). Đầu tiên, hợp chất trung gian 1 được chuyển thành hợp chất trung gian 6 bằng các phương pháp như trong Sơ đồ tổng hợp 3 (điều chế hợp chất trung gian 4 từ hợp chất trung gian 3).

Hợp chất trung gian 6 sau đó có thể được chuyển thành hợp chất trung gian 7 bằng cách khử nhóm nitro. Ví dụ, nhóm nitro có thể được khử bằng paladi trên cacbon trong khí quyển hydro (xem, ví dụ, WO2013174744 về việc khử 6-isopropoxy-5-nitro-1H-indazol thành 6-isopropoxy-1H-indazol-5-amin) hoặc bằng các sử dụng sắt và amoni clorua trong nước và etanol (xem, ví dụ, Journal of the Chemical Society, 1955, 2412-2419), hoặc bằng cách sử dụng thiếc(II) clorua (CAS 7772-99-8). Việc sử dụng sắt và amoni clorua trong nước và etanol được ưu tiên. Việc điều chế hợp chất trung gian 4 từ hợp chất trung gian 7 có thể được thực hiện tương tự như Sơ đồ tổng hợp 2 (điều chế hợp chất trung gian 3 từ hợp chất trung gian 2).

Như mô tả trong Sơ đồ tổng hợp 3, tùy ý cũng có thể sử dụng chiến lược nhóm bảo vệ trong trường hợp Sơ đồ tổng hợp 5. Tùy ý, từ hợp chất trung gian 6 hoặc hợp chất trung gian 7, như được mô tả trong Sơ đồ tổng hợp 3, cũng có thể tiến hành các

phản ứng oxy hóa hoặc khử mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết (xem, ví dụ *Science of Synthesis*, Georg Thieme Verlag).



Sơ đồ tổng hợp 5

Các phần tử thế R^1 , R^4 , R^5 mỗi nhóm như được xác định trong công thức chung

(I).

Tổng hợp các hợp chất ví dụ

Các chữ viết tắt và giải thích

DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamit
DMSO	dimetyl sulphoxit
THF	tetrahydrofuran
RT	Nhiệt độ trong phòng
HPLC	phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography)
h	(nhiều) giờ
HCOOH	axit formic
MeCN	axetonitril
min	(nhiều) phút
UPLC	phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao (ultrahigh-performance liquid chromatography)
DAD	bộ dò mảng điot (diode array detector)

ELSD	bộ dò tán xạ bay hơi (evaporating light scattering detector)
ESI	phương pháp ion hóa phun điện tử (electrospray ionization)
SQD	bộ dò tứ cực đơn (single quadrupole detector)
CPG	kính chính xác rút lõi (core-pulled precision glass)
NH ₃	amoniac

Thuật ngữ *dung dịch natri clorua* luôn chỉ dung dịch nước natri clorua bão hòa.

Danh pháp hóa học của các hợp chất trung gian và các hợp chất ví dụ được đưa ra bởi phần mềm ACD / LABS (Batch Version 12.01.).

Các phương pháp

Trong một số trường hợp, các hợp chất theo sáng chế và các tiền chất và/hoặc các hợp chất trung gian của chúng được phân tích bằng LC-MS.

Phương pháp A1: UPLC (MeCN-HCOOH):

Thiết bị: WatersWaters Acquity UPLC-MS SQD 3001; cột: Acquity UPLC BEH C18 1,7 50 x 2,1 mm; chất rửa giải A: nước + 0,1% thể tích axit formic (99%), chất rửa giải B: axetonitril; gradien: 0-1,6 phút 1-99% B, 1,6-2,0 phút 99% B; tốc độ dòng 0,8 ml/phút; nhiệt độ: 60°C; lượng bơm: 2µl; quét DAD: 210-400 nm; MS ESI+, ESI-, phạm vi quét 160-1000 m/z; ELSD.

Phương pháp A2: UPLC (MeCN-NH₃):

Thiết bị: WatersWaters Acquity UPLC-MS SQD 3001; cột: Acquity UPLC BEH C18 1,7 50 x 2,1 mm; chất rửa giải A: nước + 0,2% thể tích amoniac (32%), chất rửa giải B: axetonitril; gradien: 0-1,6 phút 1-99% B, 1,6-2,0 phút 99% B; tốc độ dòng 0,8 ml/phút; nhiệt độ: 60°C; lượng bơm: 2µl; quét DAD: 210-400 nm; MS ESI+, ESI-, phạm vi quét 160-1000 m/z; ELSD.

Phương pháp A3: (LC-MS)

Thiết bị: Agilent 1290 Infinity LC; cột: Acquity UPLC BEH C18 1,7 50 x 2,1 mm; chất rửa giải A: nước + 0,05% thể tích axit formic, chất rửa giải B: axetonitril + 0,05% thể tích axit formic; gradien: 0-1,7 phút 2-90% B, 1,7-2,0 phút 90% B; tốc độ dòng 1,2ml/phút; nhiệt độ: 60°C; lượng bơm: 2µl; quét DAD: 190-390nm; MS: Agilent TOF 6230.

Phương pháp A4: (LC-MS)

Thiết bị: Waters Acquity; cột: Kinetex (Phenomenex), 50 x 2 mm; chất rửa giải A: nước + 0,05% thể tích axit formic, chất rửa giải B: axetonitril + 0,05% thể tích axit formic; gradien: 0-1,9 phút 1-99% B, 1,9-2,1 phút 99% B; tốc độ dòng 1,5ml/phút; nhiệt độ: 60°C; lượng bơm: 0,5µl; quét DAD: 200-400nm.

Trong một số trường hợp, các hợp chất theo sáng chế và các tiền chất và/hoặc các hợp chất trung gian của chúng được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế minh họa dưới đây:

Phương pháp P1:

Hệ thống: Hệ thống Waters Autopurification: Bơm 2545, bộ quản lý mẫu 2767, CFO, DAD 2996, ELSD 2424, SQD; cột: XBridge C18 5 µm 100 x 30 mm; chất rửa giải A: nước + 0,1% thể tích axit formic, chất rửa giải B: axetonitril; gradien: 0-8 phút 10-100% B, 8-10 phút 100% B; dòng: 50ml/phút; nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng; dung dịch: tối đa 250mg / tối đa 2,5ml DMSO hoặc DMF; lượng bơm: 1 x 2,5ml; dò: bước sóng quét DAD 210–400nm; MS ESI+, ESI-, phạm vi quét 160-1000 m/z.

Phương pháp P2:

Hệ thống: Hệ thống Waters Autopurification: Pump 254, bộ quản lý mẫu 2767, CFO, DAD 2996, ELSD 2424, SQD 3100; cột: XBridge C18 5 µm 10 x 30 mm; chất rửa giải A: nước + 0,2% thể tích amoniac (32%), chất rửa giải B: metanol; gradien: 0-8 phút 30-70% B; dòng: 50 ml/phút; nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng; dò: bước sóng quét DAD 210–400nm; MS ESI+, ESI-, phạm vi quét 160-1000 m/z; ELSD.

Phương pháp P3:

Hệ thống: Labomatic, bơm: HD-5000, bộ thu hồi phân đoạn: LABOCOL Vario-4000, bộ dò UV: Knauer UVD 2,1S; cột: XBridge C18 5 µm 100x30 mm; chất rửa giải A: nước + 0,2% thể tích amoniac (25%), chất rửa giải B: axetonitril; gradien: 0-1 phút 15% B, 1-6,3 phút 15-55% B, 6,3-6,4 phút 55-100% B, 6,4-7,4 phút 100% B; dòng: 60ml/phút; nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng; dung dịch: tối đa 250mg / 2ml DMSO; lượng bơm: 2 x 2 ml; dò: UV 218 nm; phần mềm: SCPA PrepCon5.

Phương pháp P4:

Hệ thống: Labomatic, bơm: HD-5000, bộ thu hồi phân đoạn: LABOCOL Vario-4000, bộ dò UV: Knauer UVD 2,1S; cột: Chromatorex RP C18 10 μ m 125 x 30 mm; chất rửa giải A: nước + 0,1% thể tích axit formic, chất rửa giải B: axetonitril; gradien: 0-15 phút 65-100% B; dòng: 60ml/phút; nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng; dung dịch: tối đa 250mg / 2ml DMSO; lượng bơm: 2 x 2 ml; dò: UV 254 nm; phần mềm: SCPA PrepCon5.

Phương pháp P5:

Hệ thống: Sepiatec: Prep SFC100, cột: Chiralpak IA 5 μ m 250x20 mm; chất rửa giải A: cacbon dioxit, chất rửa giải B: etanol; gradien: 20% B đẳng dòng; dòng: 80 ml/phút; nhiệt độ: 40°C; dung dịch: tối đa 250 mg / 2 ml DMSO; lượng bơm: 5 x 0,4 mL; dò: UV 254 nm.

Phương pháp P6:

Hệ thống: Agilent: Prep 1200, 2 x prep pump, DLA, MWD, Gilson: Liquid Handler 215; cột: Chiralcel OJ-H 5 μ m 250 x 20 mm; chất rửa giải A: hexan, chất rửa giải B: etanol; gradien: 30% B đẳng dòng; dòng: 25 ml/phút; nhiệt độ: 25°C; dung dịch: 187 mg / 8 ml etanol/metanol; lượng bơm: 8 x 1,0 ml; dò: UV 280 nm.

Phương pháp P7:

Hệ thống: Labomatic, bơm: HD-5000, bộ thu hồi phân đoạn: LABOCOL Vario-4000, bộ dò UV: Knauer UVD 2,1S; cột: XBridge C18 5 μ m 100 x 30 mm; chất rửa giải A: nước + 0,1% thể tích axit formic, chất rửa giải B: axetonitril; gradien: 0-3 phút: 65% B đẳng dòng, 3-13 phút: 65-100% B; dòng: 60ml/phút; nhiệt độ: nhiệt độ trong phòng; dung dịch: tối đa 250mg / 2ml DMSO; lượng bơm: 2 x 2 ml; dò: UV 254 nm.

Phương pháp P8:

Hệ thống: Agilent: Prep 1200, 2 x prep pump, DLA, MWD, Gilson: Liquid Handler 215; cột: Chiralpak IF 5 μ m 250 x 20 mm; chất rửa giải A: etanol, chất rửa giải B: metanol; gradien: 50% B đẳng dòng; dòng: 25 ml/phút; nhiệt độ: 25°C; dung dịch: 600 mg / 7 ml N,N-dimetylformamit; lượng bơm: 10 x 0,7 ml; dò: UV 254 nm.

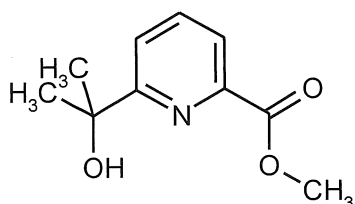
Trong một số trường hợp, hỗn hợp hợp chất có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel.

Để điều chế một số trong số các hợp chất theo sáng chế và các tiền chất và/hoặc hợp chất trung gian của chúng, phương pháp sắc ký cột (“sắc ký nhanh”) được tiến hành trên silica gel bằng thiết bị Isolera® của hãng Biotage. Phương pháp này được tiến hành bằng cách sử dụng cột của hãng Biotage, ví dụ cột "SNAP Cartridge, KP_SIL" với kích cỡ khác nhau và "cột nhanh Interchim Puriflash Silica HP 15UM" của hãng Interchim với kích cỡ khác nhau.

Nguyên liệu ban đầu

Hợp chất trung gian V2-1

Metyl 6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-carboxylat

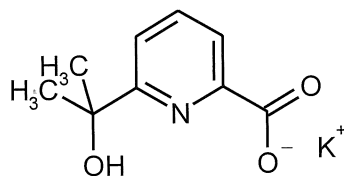


2,00 g (9,26 mmol) hợp chất 2-(6-bromopyridin-2-yl)propan-2-ol (CAS 638218-78-7) được hòa tan trong 20 ml metanol và 20 ml DMSO. Sau đó, 250 mg hợp chất 1,3-bis(diphenylphosphino)propan, 130 mg paladi(II) axetat và 3 ml triethylamine được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được sục ba lần bằng cacbon monoxit ở nhiệt độ trong phòng và khuấy trong khí quyển cacbon monoxit ở áp suất 13 bar trong 30 phút. Khí quyển cacbon monoxit được loại bỏ bằng cách áp chân không và hỗn hợp này được khuấy trong khí quyển cacbon monoxit ở áp suất 14 bar ở 100°C trong 24 giờ. Nồi hấp được hạ áp, nước được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp phản ứng được chiết ba lần bằng etyl axetat, rửa bằng dung dịch nước natri hydrocacbonat bão hòa và dung dịch natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Quá trình này tạo ra 1,60 g sản phẩm thô.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 0,76$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 195,00.

Hợp chất trung gian V3-1

Kali 6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-carboxylat

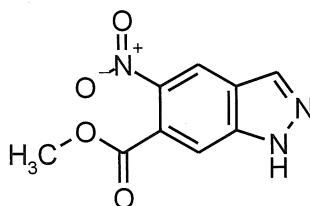


1,60 g sản phẩm thô của hợp chất trung gian 0-1 ban đầu được nạp trong 15 ml metanol, 0,74 g kali hydroxit được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 50°C trong 16,5 giờ. Sau khi cô đặc, hỗn hợp này tạo ra 2,1 g cặn mà được sử dụng không cần tinh chế tiếp.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 0,47$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 181,00.

Hợp chất trung gian 1-1

Metyl 5-nitro-1H-indazol-6-carboxylat



4,60 g (26,1 mmol) metyl 1H-indazol-6-carboxylat (CAS No: 170487-40-8) được hòa tan trong 120 ml axit sulphuric (96%) và làm mát đến -15°C trong bình ba cổ có bộ khuấy CPG, phễu nhỏ giọt và nhiệt kế bên trong. Trong khoảng thời gian 15 phút, axit nitrat hóa (10 ml axit sulphuric 96% trong 5 ml axit nitric 65%), đã điều chế và làm mát trước, được bổ sung từng giọt vào dung dịch này. Sau khi kết thúc việc bổ sung từng giọt, hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ nữa (nhiệt độ bên trong ở -13°C). Hỗn hợp phản ứng được bổ sung vào nước đá và chất kết tủa được lọc ra bằng cách hút, được rửa bằng nước và được làm khô trong tủ làm khô ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện áp suất giảm. Thu được 5,49 g hợp chất nêu ở đề mục.

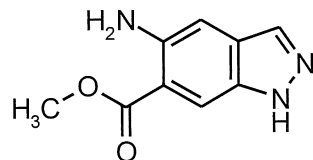
UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 0,74$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 222(M+H)^+$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3,87 (s, 3 H), 7,96 (s, 1 H), 8,44 (s, 1 H), 8,70 (s, 1 H), 13,98 (br, s., 1 H).

Hợp chất trung gian 2-1

Metyl 5-amino-1H-indazol-6-carboxylat

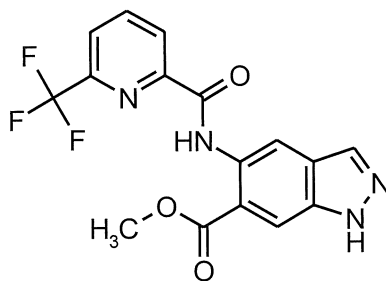


4,40 g (19,8 mmol) metyl 5-nitro-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 1-1) được hòa tan trong 236 ml metanol và hydro hóa bằng 1,06 g (0,99 mmol) paladi trên cacbon hoạt tính trong áp suất hydro chuẩn ở 25°C trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc qua xelit, bộ lọc được rửa bằng metanol, và dịch lọc được cô đặc. Thu được 3,53 g hợp chất nêu ở đề mục.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,85 (s, 3 H) 6,01 (s, 2 H) 6,98 (s, 1 H) 7,79 - 7,91 (m, 1 H) 7,99 (s, 1 H) 12,84 (br, s., 1 H).

Hợp chất trung gian 3-1

Metyl 5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl)amino)-1H-indazol-6-carboxylat



4,95 g (25,9 mmol) axit 6-(triflometyl)pyridin-2-carboxylic ban đầu được nạp trong 45 ml THF. 9,07 g (28,2 mmol) O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametylrioni tetrafloborat và 4,92 ml (28,2 mmol) N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 30 phút. Sau đó, 4,50 g (23,5 mmol) metyl 5-amino-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 2-1) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc bằng cách hút qua màng lọc và các chất rắn được rửa bằng THF và bằng nước, và làm khô qua đêm trong lò sấy. Thu được 7,60 g hợp chất nêu ở đề mục.

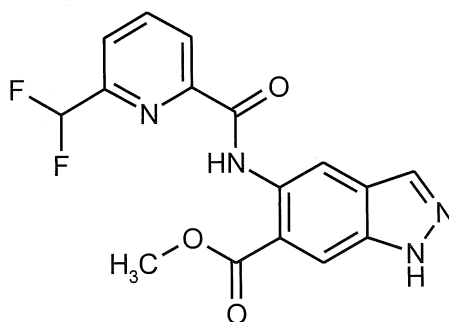
UPLC-MS (Phương pháp A2): R_t = 1,16 phút

MS (ESIpos): $m/z = 365 (M+H)^+$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3,97 (s, 3 H), 8,13 - 8,27 (m, 2 H), 8,30 (s, 1 H), 8,33 - 8,45 (m, 1 H), 8,45 - 8,51 (m, 1 H), 9,15 (s, 1 H), 12,57 (s, 1 H), 13,44 (s, 1 H).

Hợp chất trung gian 3-2

Metyl 5-({[6-(diflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat

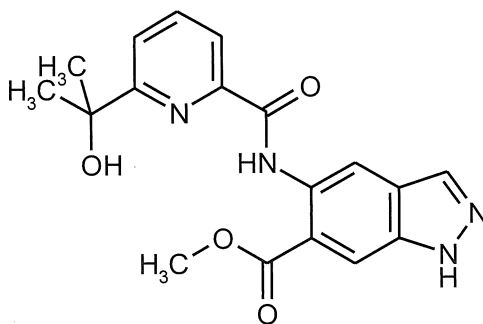


2,85 g (23,5 mmol) axit 6-(diflometyl)pyridin-2-carboxylic ban đầu được nạp trong 30 ml THF. 6,05 g (18,8 mmol) O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloroborat và 3,3 ml N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Sau đó, 3,00 g (15,7 mmol) metyl 5-amino-1H-indazol-6-carboxylat được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được phối trộn với nước, và chất kết tủa được lọc ra bằng cách hút và rửa lặp đi lặp lại bằng nước và diclometan. Quy trình này tạo ra 1,53 g (27% so với lý thuyết) hợp chất nêu ở đề mục. Các pha của dịch lọc được tách, pha hữu cơ được cô đặc, phối trộn với một ít diclometan và tạo huyền phù trong bể siêu âm, và chất kết tủa được lọc ra bằng cách hút. Quy trình này tạo ra thêm 1,03 g hợp chất nêu ở phần đề mục.

^1H -NMR (phân đoạn sản phẩm đầu tiên, 300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 3,99 (s, 3H), 7,09 (t, 1H), 8,00 (d, 1H), 8,21 - 8,40 (m, 4H), 9,14 (s, 1H), 12,53 (s, 1H), 13,44 (s, 1H).

Hợp chất trung gian 3-3

Metyl 5-({[6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat



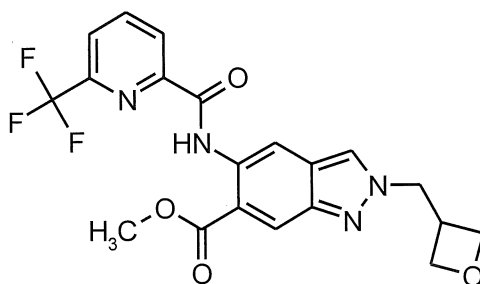
2,10 g kali 6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-carboxylat (hợp chất trung gian V3-1) ban đầu được nạp trong 15 ml THF. 3,69 g (11,5 mmol) O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetraflororat và 2,00 ml N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Sau đó, 1,83 g (9,58 mmol) metyl 5-amino-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 2-1) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 19 giờ. Hỗn hợp này được phối trộn với nước và etyl axetat, các chất rắn không tan được lọc ra, các pha của dịch lọc được tách, và pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat, rửa bằng dung dịch natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước, cô đặc và tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (hexan/etyl axetat). Sau khi loại bỏ dung môi, thu được 1,56 g hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng bột màu vàng.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,00$ phút (bộ dò UV: TIC Smooth), khối lượng phát hiện được 354,00.

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,63 (s, 6H), 3,97 (s, 3H), 5,37(s, 1H), 7,90 - 7,95 (m, 1H), 8,03-8,07 (m, 2H), 8,23(s, 1H), 8,29 (s, 1H), 9,19 (s, 1H), 12,79 (s, 1H), 13,41 (br.s., 1H).

Hợp chất trung gian 4-1

Metyl 2-(oxetan-3-ylmetyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl} amino)-2H-indazol-6-carboxylat



1,00 g (2,66 mmol) metyl 5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1) được hòa tan trong 10 ml DMF và, sau khi bổ sung 1,10 g (7,99 mmol) kali cacbonat và 221 mg (1,33 mmol) kali iodua, hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 30 phút, 603 mg (3,99 mmol) 3-bromometyloxetan được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tách giữa nước và etyl axetat. Hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Thu được 260 mg hợp chất nêu ở đề mục.

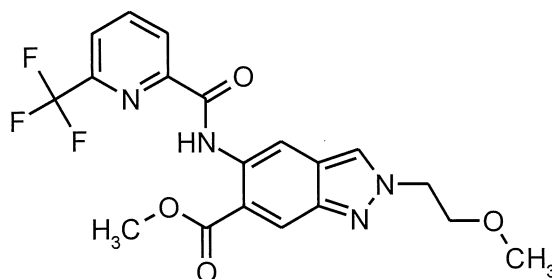
UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,24$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 435(M+H)^+$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3,49 - 3,64 (m, 1 H), 3,95 (s, 3 H), 4,49 (t, 2 H), 4,68 (dd, 2 H), 4,81 (d, 2 H), 8,20 (dd, 1 H), 8,35 - 8,41 (m, 1 H), 8,43 - 8,49 (m, 2 H), 8,55 - 8,58 (m, 1 H), 9,06 (s, 1 H), 12,53 (s, 1 H).

Hợp chất trung gian 4-2

Metyl 2-(2-metoxyetyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat



1,00 g (2,75 mmol) metyl 5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1) được hòa tan trong 5 ml DMF, và 387 μl

(4,12 mmol) 2-bromoethyl methyl ete, 1,14 g (8,23 mmol) kali cacbonat và 228 mg (1,37 mmol) kali iodua được bổ sung vào trong khi khuấy. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 24 giờ, pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Thu được 12 mg hợp chất nêu ở đề mục.

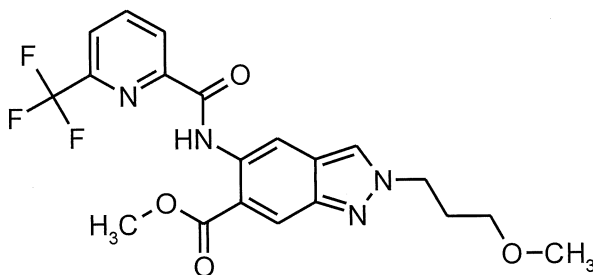
UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,24$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 423$ (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,24 (s, 3 H), 3,86 (t, 2 H), 3,96 (s, 3 H), 4,65 (t, 2 H), 8,21 (dd, 1 H), 8,35 - 8,42 (m, 1 H), 8,43 - 8,51 (m, 2 H), 8,52 (d, 1 H), 9,06 (s, 1 H), 12,53 (s, 1 H).

Hợp chất trung gian 4-3

Methyl 2-(3-metoxypopyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl} amino)-2H-indazol-6-carboxylat



1,00 g (2,75 mmol) methyl 5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl} amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1) được hòa tan trong 5 ml DMF, và 460 μ l (4,12 mmol) 1-bromo-3-metoxypopyl, 1,14 g (8,23 mmol) kali cacbonat và 228 mg (1,37 mmol) kali iodua được bổ sung vào trong khi khuấy. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 72 giờ, pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Thu được 28 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,29$ phút

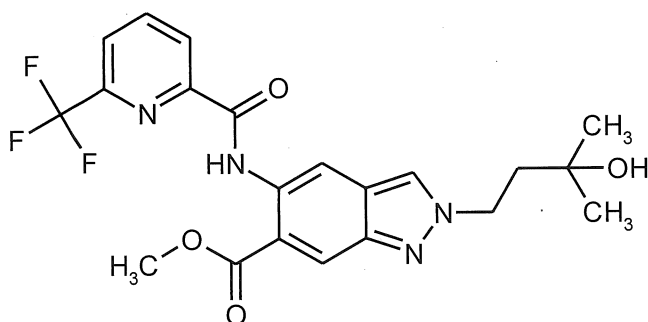
MS (ESIpos): $m/z = 437$ (M+H)⁺

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 2,17 (quin, 2 H), 3,24 (s, 3 H), 3,33 - 3,36 (m, 2 H), 3,96 (s, 3 H), 4,53 (t, 2 H), 8,21 (dd, 1 H), 8,35 - 8,42 (m, 1 H), 8,45 - 8,49 (m, 2 H), 8,54 (d, 1 H), 9,06 (s, 1 H), 12,54 (s, 1 H).

Hợp chất trung gian 4-4

Metyl 2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat

Phương pháp điều chế 1



930 mg (2,55 mmol) metyl 5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1), 1,06 g kali cacbonat và 212 mg kali iodua ban đầu được nạp trong 9 ml DMF và hỗn hợp này được khuấy trong 15 phút. Sau đó, 0,62 ml 4-bromo-2-metylbutan-2-ol được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 60°C trong 16 giờ, Hỗn hợp này được phối trộn với nước và chiết hai lần bằng etyl axetat, và phần chiết được rửa ba lần bằng dung dịch natri clorua bão hòa, lọc và cô đặc. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (hexan/etyl axetat) tạo ra 424 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A2): R_t = 1,21 phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 450,00.

^1H -NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,16 (s, 6 H) 2,02 - 2,11 (m, 2 H) 3,96 (s, 3 H) 4,51 - 4,60 (m, 3 H) 8,20 (dd, $J=7,83$, 1,01 Hz, 1 H) 8,39 (s, 1 H) 8,45 (s, 2 H) 8,55 (d, $J=0,76$ Hz, 1 H) 9,05 (s, 1 H) 12,52 (s, 1 H).

Phương pháp điều chế 2

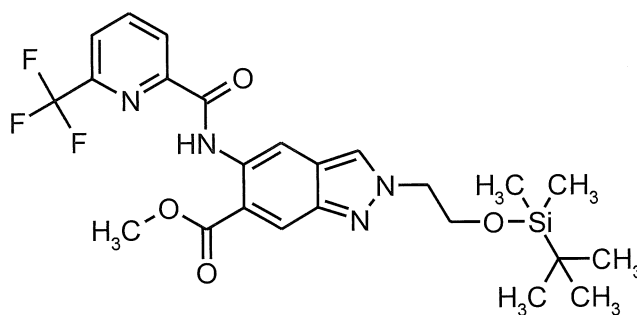
1,95 g (7,03 mmol) metyl 5-amino-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 7-1) ban đầu được nạp trong 30 ml THF. 1,48 g (7,73

mmol) axit 6-(triflometyl)pyridin-2-carboxylic, 2,71 g (8,44 mmol) O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetraflororat và 1,47 ml (8,44 mmol) N-etyl-N-isopropylpropan-2-amin được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 20,5 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat và các phần chiết được rửa bằng dung dịch natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được tách bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (gradien hexan/etyl axetat). Thu được 2,79 g hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,23$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 450,00.

Hợp chất trung gian 4-5

Metyl 2-(2-{[tert-butyl(dimetyl)silyl]oxy}etyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat



1,00 g (2,66 mmol, 97%) metyl 5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1) ban đầu được nạp trong 50 ml DMF, 1,10 g (7,99 mmol) kali cacbonat và 221 mg (1,33 mmol) kali iodua được bổ sung vào trong khi khuấy, và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 30 phút. Sau đó, 857 μ l (3,99 mmol) (2-bromoetoxy)(tert-butyl)dimetylsilan được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và chiết bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Thu được 400 mg hợp chất nêu ở đề mục.

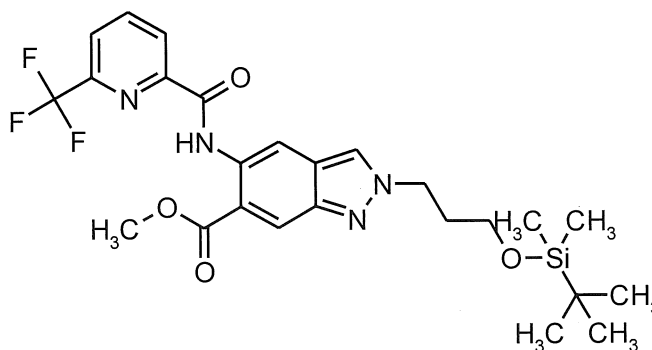
UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,58$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 523(M+H)^+$

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -0,18 - -0,13 (m, 6 H), 0,74 (s, 9 H), 3,96 (s, 3 H), 4,08 (t, 2 H), 4,57 (t, 2 H), 8,15 - 8,25 (m, 1 H), 8,32 - 8,43 (m, 1 H), 8,43 - 8,52 (m, 3 H), 9,07 (s, 1 H), 12,53 (s, 1 H).

Hợp chất trung gian 4-6

Metyl 2-(3-{{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}propyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat



Tương tự như hợp chất trung gian 4-5, 1,00 g (2,75 mmol) metyl 5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1) được hòa tan trong 10 ml DMF, 1,14 g (8,24 mmol) kali cacbonat và 228 mg (1,37 mmol) kali iodua được bổ sung vào trong khi khuấy, và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 30 phút. Sau đó, 1,04 g (4,12 mmol) (3-bromopropoxy)(tert-butyl)dimetylsilan được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc và bánh lọc được rửa bằng etyl axetat. Hỗn hợp phản ứng được tách giữa nước và etyl axetat và pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Tinh chế phần cặn bằng phương pháp HPLC điều chế tạo ra 428 mg hợp chất nêu ở đề mục.

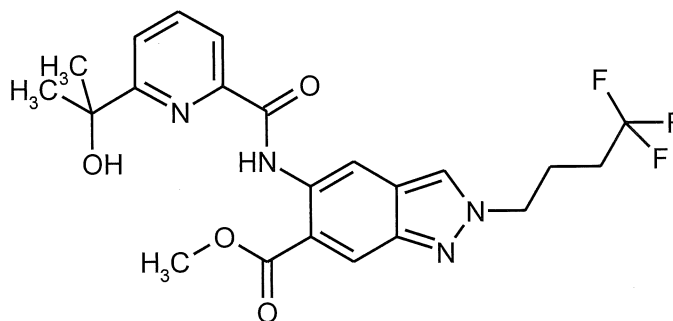
UPLC-MS (Phương pháp A1): R_t = 1,63 phút

MS (ESIpos): m/z = 537($M+H$) $^+$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -0,02 - 0,06 (m, 6 H), 0,87 (s, 9 H), 2,14 (quin, 2 H), 3,62 (t, 2 H), 3,96 (s, 3 H), 4,54 (t, 2 H), 8,20 (d, 1 H), 8,35 - 8,42 (m, 1 H), 8,43 - 8,48 (m, 3 H), 8,49 - 8,53 (m, 1 H), 9,06 (s, 1 H).

Hợp chất trung gian 4-7

Metyl 5-([6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-6-carboxylat

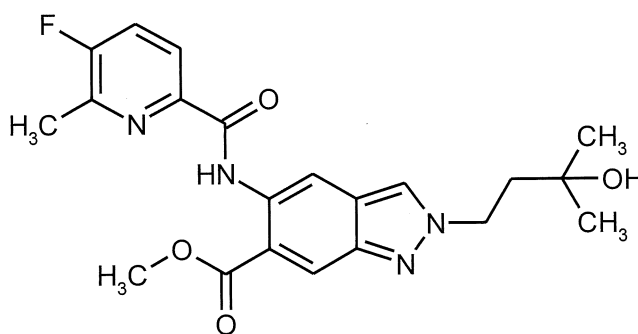


300 mg (0,80 mmol) metyl 5-([6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-3) ban đầu được nạp trong 4,5 ml DMF. 287 mg (1,21 mmol) 1,1,1-triflo-4-iodobutan và 333 mg kali cacbonat được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 100°C trong 23 giờ, nước được bổ sung vào, và hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat. Hỗn hợp này được cô đặc và sản phẩm được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Quy trình này tạo ra 72 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,26$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 464,17.

Hợp chất trung gian 4-8

Metyl 5-([(5-flo-6-metylpyridin-2-yl)cacbonyl]amino)-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat



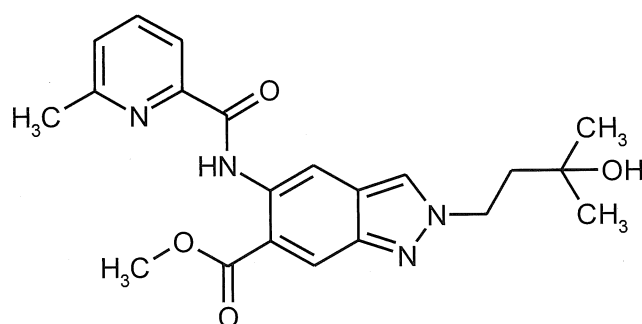
195 mg (0,46 mmol) metyl 5-amino-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 7-1) được cho phản ứng với 78 mg (0,50 mmol) axit 5-flo-6-metylpyridin-2-carboxylic tương tự như hợp chất trung gian 4-4 (Phương pháp

điều chế 2) trong 19,5 giờ. Thu được 228 mg sản phẩm thô sau khi làm sạch bằng nước theo cách tương tự.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,20$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 414,00.

Hợp chất trung gian 4-9

Metyl 2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-5-{{[6-metylpyridin-2-yl]cacbonyl}amino}-2H-indazol-6-carboxylat

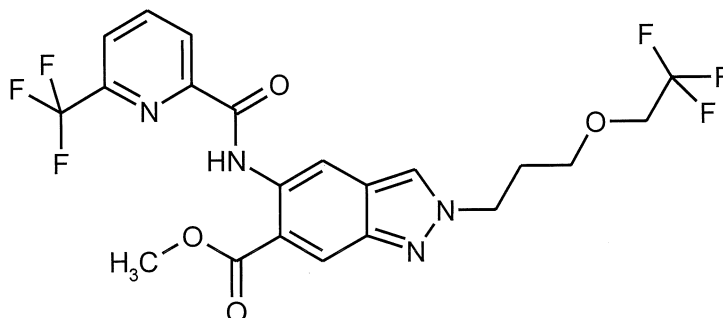


195 mg (0,45 mmol) metyl 5-amino-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 7-1) được cho phản ứng với 70 mg (0,50 mmol) axit 6-metylpyridin-2-carboxylic tương tự như quy trình điều chế hợp chất trung gian 4-4 (Phương pháp điều chế 2) trong 19,5 giờ. Thu được 278 mg hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng sản phẩm thô sau khi làm sạch bằng nước theo cách tương tự.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,14$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 396,00.

Hợp chất trung gian 4-10

Metyl 2-[3-(2,2,2-trifloetoxy)propyl]-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat

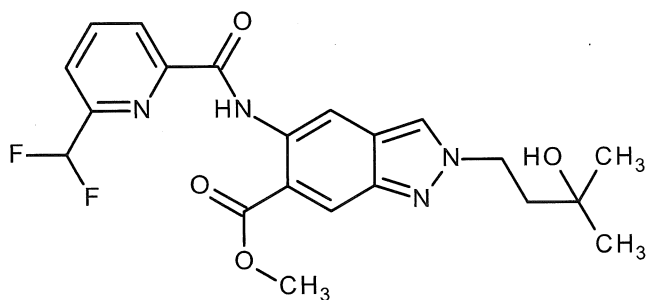


Hỗn hợp chứa 250 mg (0,58 mmol) metyl 5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1), 193 mg (0,88 mmol) 3-bromopropyl 2,2,2-trifloetyl ete, 242 mg kali cacbonat và 145 mg kali iodua trong 3 ml DMF được khuấy ở 100°C trong 20 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết bằng etyl axetat và phần chiết được rửa bằng natri clorua solution và cô đặc. Tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế tạo ra 52 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,39$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 504,12.

Hợp chất trung gian 4-11

Metyl 5-([6-(diflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat



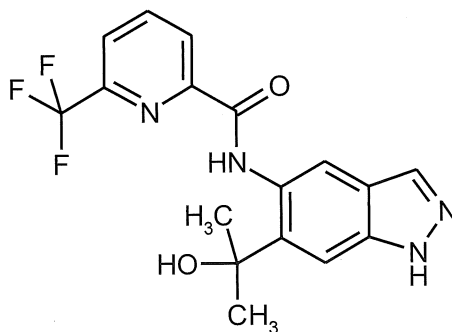
2,00 g metyl 5-amino-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 7-1) ban đầu được nạp trong 40 ml THF. 1,50 g axit 6-(diflometyl)pyridin-2-carboxylic, 2,78 g *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroni tetrafloborat (TBTU, CAS Number 125700-67-6) và 1,5 ml *N*-etyl-*N*-isopropylpropan-2-amin được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua và lọc qua màng lọc kỵ nước. Hỗn hợp này được cô đặc và phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (hexan/etyl axetat). Quy trình này tạo ra 3,05 g hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng chất rắn màu vàng.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,15$ phút (bộ dò UV TIC), khối lượng phát hiện được 432,00.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,17 (s, 6H), 2,04 - 2,11 (m, 2H), 3,99 (s, 3H), 4,52 - 4,60 (m, 3H), 7,10 (t, 1H), 8,00 (dd, 1H), 8,28 - 8,38 (m, 2H), 8,44 - 8,47 (m, 1H), 8,56 (d, 1H), 9,05 (s, 1H), 12,49 (s, 1H).

Hợp chất trung gian 5-1

N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-cacboxamit

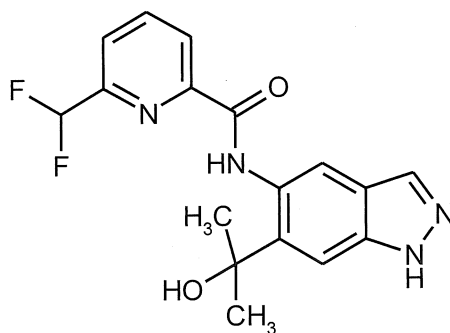


Bổ sung cẩn thận 6,9 ml (5 đương lượng) dung dịch metylmagie bromua 3M trong dietyl ete vào dung dịch, đã làm mát trong bể làm mát bằng nước đá, chứa 1,50 g (4,12 mmol) metyl 5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl)amino)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-1) trong 20 ml THF. Hỗn hợp này được khuấy trong khi làm mát bằng bể nước đá trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 19,5 giờ. 2 đương lượng dung dịch metylmagie bromua nữa được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ nữa. Dung dịch nước ammoni clorua bão hòa được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy và chiết ba lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua, được lọc qua bộ lọc kị nước và được cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Thu được 763 mg hợp chất nêu ở đề mục.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,63 (s, 6H), 5,99 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 8,14 - 8,19 (m, 1H), 8,37 (t, 1H), 8,46 (d, 1H), 8,78 (s, 1H), 12,32 (s, 1H), 12,97 (s, 1H).

Hợp chất trung gian 5-2

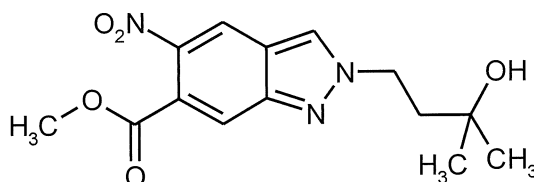
6-(Diflometyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit



Tương tự quy trình điều chế hợp chất trung gian 5-1, 2,40 g (6,93 mmol) methyl 5-((6-(difluoromethyl)pyridin-2-yl)carbamoyl)-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 3-2) trong 10 ml THF được cho phản ứng với ba phần dung dịch metylmagie bromua 3M trong dietyl ete (6,9 ml, sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 45 phút; 11,6 ml, sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ; 6,9 ml, sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ). Sau khi làm sạch như đối với hợp chất trung gian 5-1, thu được 2,39 g sản phẩm thô, mà được sử dụng tiếp mà không cần tinh chế thêm.

Hợp chất trung gian 6-1

Methyl 2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-5-nitro-2H-indazol-6-carboxylat



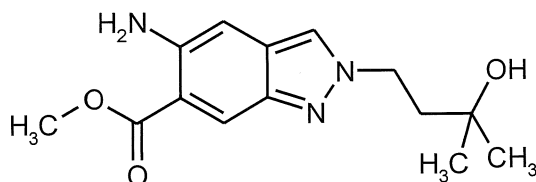
5,00 g (22,6 mmol) methyl 5-nitro-1H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 1-1) ban đầu được nạp trong 40 ml DMF. 5,65 g (33,9 mmol) 4-bromo-2-metylbutan-2-ol, 9,37 g (67,8 mmol) kali cacbonat và 5,63 g (33,9 mmol) kali iodua được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 100°C trong 20 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat và các phần chiết được rửa bằng dung dịch natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Các chất rắn thu được được khuấy với dietyl ete, lọc ra bằng cách hút, rửa bằng dietyl ete và làm khô. Thu được 2,49 g hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 0,93$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 307,00.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,15 (s, 6H), 2,02 - 2,11 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 4,54 (s, 1H), 4,58 - 4,65 (m, 2H), 8,05 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,86 (s, 1H).

Hợp chất trung gian 7-1

Metyl 5-amino-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat



4,53 g sắt và 217 mg amoni clorua được bổ sung vào 2,49 g (8,10 mmol) metyl 2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-5-nitro-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 6-1) trong 30 ml etanol và 10 ml nước, và hỗn hợp này được khuấy ở 90°C trong 21,5 giờ. Hỗn hợp này được lọc qua xelit và rửa kỹ ba lần bằng etanol, và dịch lọc được cô đặc và phần cặn được phối trộn với nước. Thực hiện việc chiết ba lần bằng etyl axetat (để cải thiện sự tách pha, dung dịch natri clorua được bổ sung vào). Các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua, được lọc qua bộ lọc kị nước và được cô đặc. Quy trình này tạo ra 1,95 g (85% so với lý thuyết) hợp chất nêu ở đề mục.

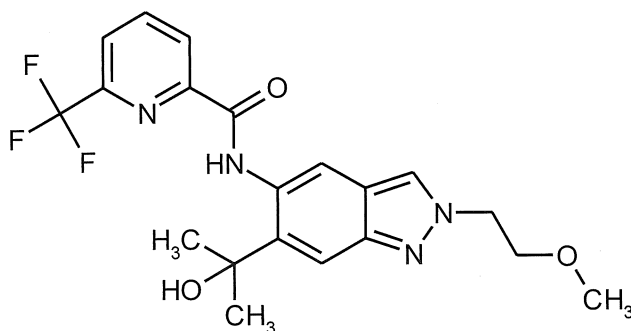
UPLC-MS (Phương pháp A1): R_t = 0,67 phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 277,00.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,14 (s, 6H), 1,96 - 2,08 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 4,39 - 4,51 (m, 3H), 5,81 (s, 2H), 6,80 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,18 (s, 1H).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(2-metoxetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



75 mg (0,18 mmol) metyl 2-(2-metoxetyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-2) được hòa tan trong 500 μ l THF và phối trộn với 887 μ l (0,89 mmol) dung dịch metylmagie bromua 1 M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 60 phút. Sau đó, 1 ml dung dịch nước ammoni clorua bão hòa được cẩn thận bổ sung vào và hỗn hợp này được lọc. Pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ được kết hợp, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được hòa tan trong 3 ml DMSO và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Các phân đoạn chứa sản phẩm được đông khô. Thu được 20 mg hợp chất nêu ở đề mục.

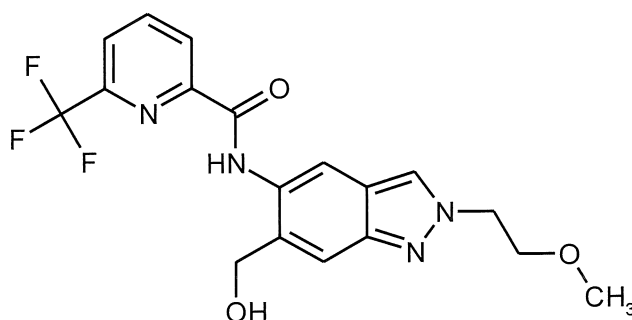
UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,08$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 423$ (M+H)⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,62 (s, 6 H), 3,22 (s, 3 H), 3,82 (t, 2 H), 4,55 (t, 2 H), 5,96 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,16 (d1 H), 8,29 - 8,42 (m, 2 H), 8,42 - 8,50 (m, 1 H), 8,71 (s, 1 H), 12,36 (s, 1 H)

Ví dụ 2

N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(2-metoxetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



13 mg (0,36 mmol) lithi nhôm hydrua được tạo huyền phù trong 1 ml THF và hỗn hợp này được làm mát đến 0°C, 75 mg (0,17 mmol) metyl 2-(2-metoxetyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-2) hòa tan trong 500 µl THF được bổ sung vào từng giọt và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 60 phút, hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước, cô đặc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm thấp. Quy trình này tạo ra 13 mg hợp chất nêu ở đề mục.

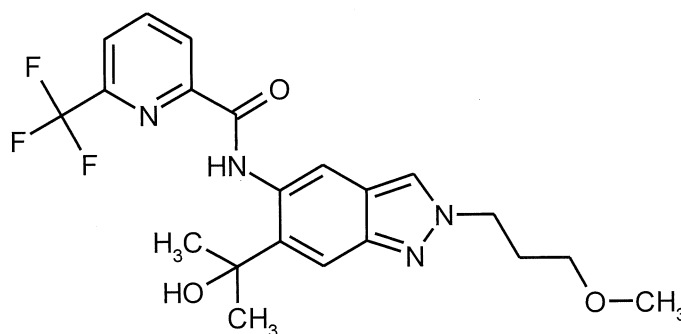
UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 0,99$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 394$ ($M+H$)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,23 (s, 3 H), 3,83 (t, 2 H), 4,56 (t, 2 H), 4,69 (d, 2 H), 5,77 (t, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,19 (d, 1 H), 8,33 - 8,41 (m, 2 H), 8,43 - 8,47 (m, 1 H), 8,51 (s, 1 H), 11,20 (s, 1 H)

Ví dụ 3

N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(3-metoxypopyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



75 mg (0,17 mmol) metyl 2-(3-metoxypopyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-3) được hòa tan trong 500 µl THF và phối trộn với 859 µl (0,86 mmol) dung dịch metylmagie bromua 1 M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 60 phút. Sau đó, 1 ml dung dịch amoni clorua bão hòa được cẩn thận bổ sung vào và hỗn hợp này được lọc. Pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ được kết hợp, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được hòa tan trong 3 ml DMSO và tinh chế bằng

phương pháp HPLC điều chế. Các phân đoạn chứa sản phẩm được đông khô. Thu được 25 mg hợp chất nêu ở đề mục.

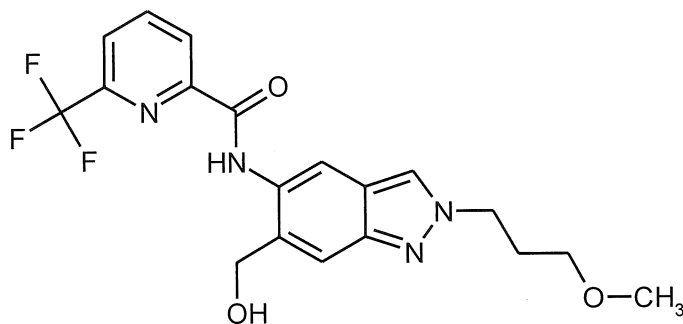
UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,13$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 437$ ($M+H$)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1,62 (s, 6 H), 2,14 (quin, 2 H), 3,23 (s, 3 H), 3,26 - 3,32 (m, 2 H), 4,44 (t, 2 H), 5,95 (s, 1 H), 7,58 (s, 1 H), 8,16 (d, 1 H), 8,31 - 8,40 (m, 2 H), 8,43 - 8,48 (m, 1 H), 8,72 (s, 1 H), 12,36 (s, 1 H).

Ví dụ 4

N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(3-metoxypopyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



13 mg lithi nhôm hydrua được tạo huyền phù trong THF và hỗn hợp này được làm mát đến 0°C, 75 mg (0,17 mmol) metyl 2-(3-metoxypopyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-3) trong THF được bổ sung vào từng giọt và hỗn hợp này được để cho đạt đến nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và lọc, phần cặn được rửa bằng etyl axetat và dịch lọc được chiết bằng etyl axetat. Các pha etyl axetat kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế.

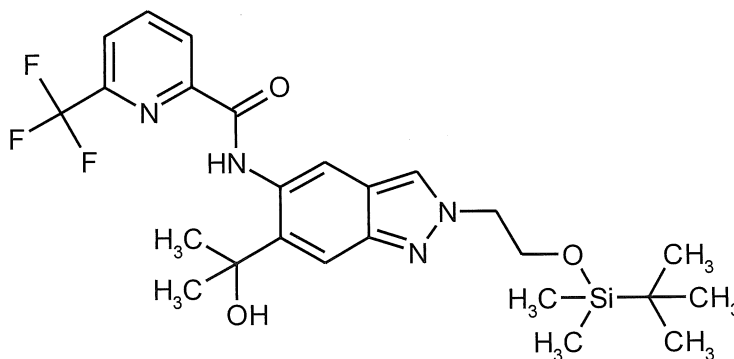
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2,14 (quin, 2 H), 3,23 (s, 3 H), 3,29 (t, 2 H), 4,45 (t, 2 H), 4,68 (d, 2 H), 5,77 (t, 1 H), 7,58 (s, 1 H), 8,18 (d, 1 H), 8,32 - 8,48 (m, 3 H), 8,51 (s, 1 H), 11,21 (s, 1 H).

Ví dụ 5

N-[2-(2-Hydroxyethyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit

Giai đoạn A:

Điều chế N-[2-(2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}ethyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



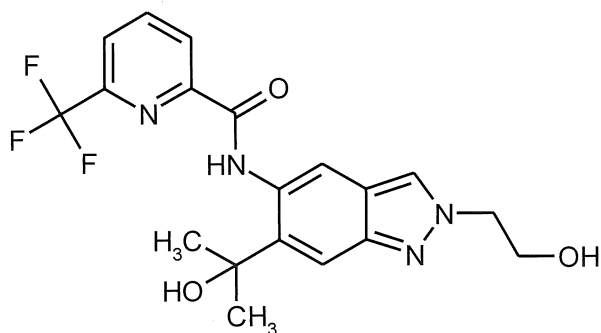
100 mg (0,19 mmol) methyl 2-(2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}ethyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl)amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-5) được hòa tan trong 1 ml THF và phối trộn với 669 μ l (0,67 mmol) dung dịch metylmagie bromua 1 M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 60 phút. Thêm 287 μ l (0,29 mmol) dung dịch metylmagie bromua 1 M trong THF được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 3 giờ. Sau đó, 20 ml dung dịch amoni clorua bão hòa được cẩn thận bổ sung vào và hỗn hợp này được lọc. Pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ được kết hợp, làm khô qua magie sulphat, lọc, cô đặc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm thấp. Quy trình này tạo ra 50 mg N-[2-(2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}ethyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit.

UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,51$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 523(M+H)^+$

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -0,17 - -0,09 (m, 6 H), 0,78 (s, 9 H), 1,62 (s, 6 H), 4,04 (t, 2 H), 4,47 (t, 2 H), 5,98 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,16 (d, 1 H), 8,29 (s, 1 H), 8,37 (t, 1 H), 8,45 (d, 1 H), 8,73 (s, 1 H), 12,38 (s, 1 H).

Giai đoạn B:



50 mg (96 μ mol) N-[2-(2-{{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}ethyl)-6-(hydroxymethyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamid được hòa tan trong 1,0 ml THF và phối trộn với 144 μ l (0,14 mmol) dung dịch tetrabutylamonium florua 1 M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng ethyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Quy trình này tạo ra 36 mg N-[2-(2-hydroxyethyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamid (Ví dụ 5).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,62 (s, 6H), 3,86 (q, 2H), 4,43 (t, 2H), 4,95 (t, 1H), 5,94 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 8,16 (dd, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,37 (t, 1H), 8,45 (d, 1H), 8,72 (s, 1H), 12,36 (s, 1H).

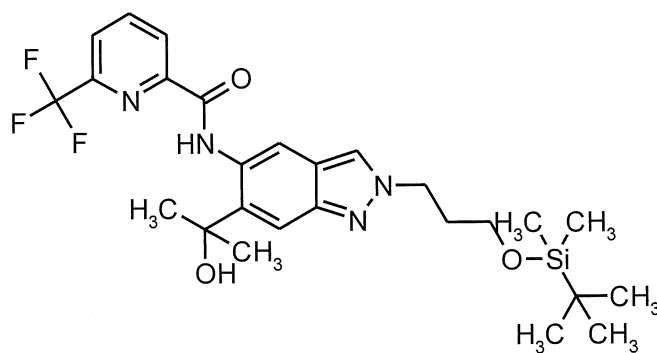
UPLC-MS (Phương pháp A2): R_t = 0,97 phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 408,00.

Ví dụ 6

N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypropyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamid

Giai đoạn A:

Điều chế N-[2-(3-{{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}propyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamid



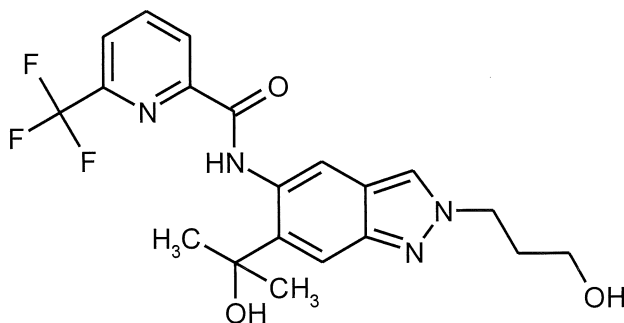
50 mg (0,09 mmol) metyl 2-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-5-({[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-6) được hòa tan trong 500 μ l THF và phối trộn với 326 μ l (0,33 mmol) dung dịch metylmagie bromua 1 M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 60 phút. Sau đó, 20 ml dung dịch amoni clorua bão hòa được cẩn thận bổ sung vào và hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được lọc qua màng lọc kỵ nước, cô đặc và làm khô trong điều kiện áp suất giảm thấp. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Thu được 40 mg N-[2-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamit.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,58$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 537(M+H)^+$

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 0,02 - 0,05 (m, 6 H), 0,84 - 0,91 (m, 9 H), 1,62 (s, 6 H), 2,02 - 2,18 (m, 2 H), 3,55 - 3,62 (m, 2 H), 4,45 (t, 2 H), 5,96 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,16 (d, 1 H), 8,31 (s, 1 H), 8,33 - 8,42 (m, 1 H), 8,45 (d, 1 H), 8,72 (s, 1 H), 12,37 (s, 1 H).

Giai đoạn B:



37 mg (0,07 mmol) N-[2-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit được hòa tan trong 500 μ l THF và phối trộn với 207 μ l (0,21 mmol) dung dịch tetrabutylamoni florua 1M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 2 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa, lọc và cô đặc. Sau khi tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế, thu được 10 mg N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypropyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (Ví dụ 6, chứa thành phần thứ cấp).

UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,00$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 423$ ($M+H$)⁺

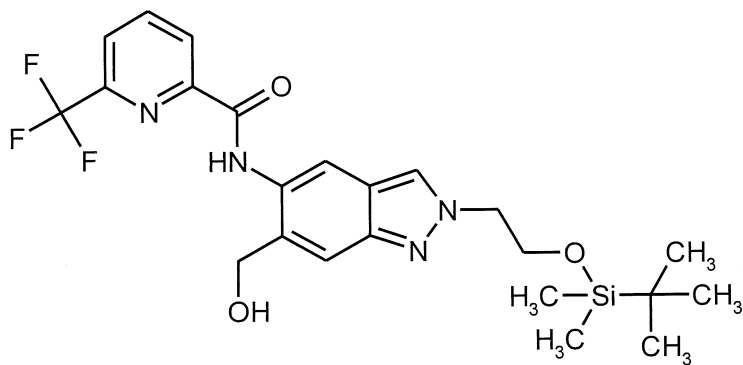
Các tín hiệu ¹H NMR chọn lọc (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,61 (s), 2,00 - 2,12 (m), 3,38 (t, 2 H), 4,44 (t, 2 H), 4,62 (br, s, 1 H), 5,93 (br, s, 1 H), 7,55 (s, 1 H), 8,13 (d, 1 H), 8,27 - 8,38 (m, 2 H), 8,43 (d, 1 H), 8,71 (s, 1 H), 12,30 (br, s, 1 H),

Ví dụ 7

N-[2-(2-Hydroxyetyl)-6-(hydroxymetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit

Giai đoạn A:

N-[2-(2-{[tert-Butyl(dimethyl)silyl]oxy}etyl)-6-(hydroxymetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



100 mg (0,19 mmol) metyl 2-(2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}etyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung

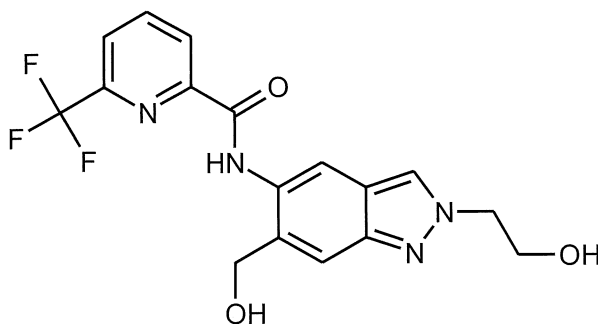
gian 4-5) được hòa tan trong 1 ml THF và phối trộn với 191 μ l (0,38 mmol) dung dịch lithi bohydrua 2M. Hỗn hợp này được để cho khuấy ở 25°C trong 24 giờ, 14 mg (0,38 mmol) natri bohydrua và 500 μ l metanol được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 4 giờ. Thêm 14 mg (0,38 mmol) natri bohydrua được bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy ở 25°C trong 24 giờ, nước được cẩn thận bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và pha hữu cơ được loại bỏ. Sau đó, hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được xử lý trong 2 ml DMSO và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Quy trình này tạo ra 30 mg N-[2-(2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}ethyl)-6-(hydroxymethyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit.

UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,44$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 495(M+H)^+$

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -0,16 - -0,12 (m, 6 H), 0,75 - 0,79 (m, 9 H), 4,05 (t, 2 H), 4,48 (t, 2 H), 4,69 (d, 2 H), 5,75 - 5,77 (m, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,18 (dd, 1 H), 8,30 - 8,33 (m, 1 H), 8,38 (t, 1 H), 8,45 (d, 1 H), 8,51 (s, 1 H), 11,20 (s, 1 H).

Giai đoạn B:



33 mg (0,07 mmol) N-[2-(2-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}ethyl)-6-(hydroxymethyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit được hòa tan trong 1 ml THF và phối trộn với 100 μ l (0,10 mmol) dung dịch tetrabutylamoni florua 1 M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 1 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước, cô đặc và làm khô

trong điều kiện áp suất giảm thấp. Thu được 25 mg N-[2-(2-hydroxyetyl)-6-(hydroxymetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (Ví dụ 7).

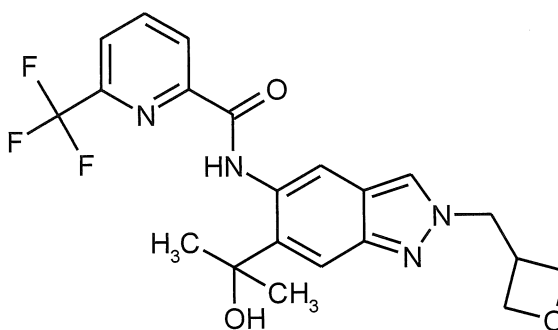
UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 0,87$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 381$ (M+H)⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,87 (q, 2 H), 4,44 (t, 2 H), 4,69 (d, 2 H), 4,98 (t, 1 H), 5,70 - 5,81 (m, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,11 - 8,23 (m, 1 H), 8,31 - 8,42 (m, 2 H), 8,43 - 8,49 (m, 1 H), 8,51 (s, 1 H), 11,20 (s, 1 H).

Ví dụ 8

N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(oxetan-3-ylmetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



50 mg (0,12 mmol) metyl 2-(oxetan-3-ylmetyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-1) được hòa tan trong 500 μ l THF và phối trộn với 576 μ l (0,58 mmol) dung dịch metylmagie bromua 1M trong THF. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 60 phút. Sau đó, 20 ml dung dịch nước ammoni clorua bão hòa được cẩn thận bổ sung vào và hỗn hợp này được cô đặc. Pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ được kết hợp, làm khô qua magie sulphat, lọc và cô đặc. Phần cặn được hòa tan trong 2,0 ml DMSO và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Các phân đoạn chứa sản phẩm được đông khô. Thu được 30 mg hợp chất nêu ở đề mục.

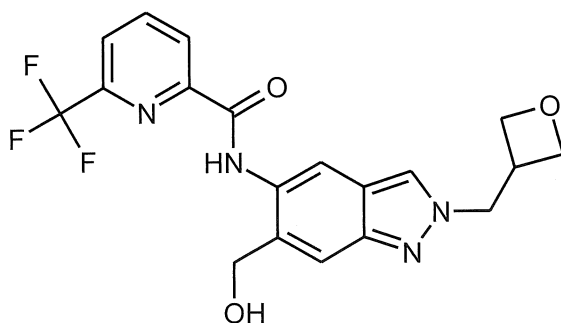
UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,03$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 435$ (M+H)⁺

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,62 (s, 6 H), 3,45 - 3,61 (m, 1 H), 4,48 (t, 2 H), 4,66 (dd, 2 H), 4,72 (d, 2 H), 5,94 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 8,16 (d, 1 H), 8,33 - 8,42 (m, 2 H), 8,42 - 8,47 (m, 1 H), 8,72 (s, 1 H), 12,36 (s, 1 H).

Ví dụ 9

N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(oxetan-3-ylmetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



75 mg (0,17 mmol) metyl 2-(oxetan-3-ylmetyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-1) được hòa tan trong 1 ml hỗn hợp THF/metanol (1:1), và 8 mg (0,21 mmol) natri bohydrua được bổ sung vào. Hỗn hợp này được để cho khuấy ở 25°C trong 60 phút. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc, và phần cặn được phối trộn với nước. Huyền phù này khuấy mãnh liệt trong 15 phút, và các chất rắn lọc ra bằng cách hút, rửa hai lần bằng nước và hai lần bằng dietyl ete, và làm khô trong điều kiện áp suất giảm thấp. Thu được 48 mg hợp chất nêu ở đề mục.

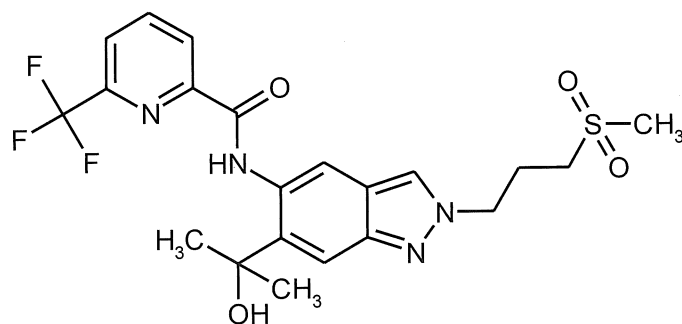
UPLC-MS (Phương pháp A2): R_t = 0,94 phút

MS (ESIpos): m/z = 407 ($M+H$)⁺

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3,55 (s, 1 H), 4,48 (t, 2 H), 4,61 - 4,77 (m, 6 H), 7,57 (s, 1 H), 8,18 (dd, 1 H), 8,33 - 8,49 (m, 3 H), 8,51 (s, 1 H), 11,21 (s, 1 H).

Ví dụ 10

N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(metylsulphonyl)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



Hỗn hợp chứa 500 mg (1,32 mmol) N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamid (hợp chất trung gian 5-1), 569 mg kali cacbonat và 114 mg kali iodua trong 5,0 ml DMF được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. 414 mg 1-bromo-3-(metylsulphonyl)propan được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat và các phần chiết được rửa bằng dung dịch natri clorua và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột (gradient diclometan/metanol). Phân đoạn sản phẩm được khuấy với dietyl ete, lọc và làm khô. Thu được 59 mg hợp chất nêu ở đề mục.

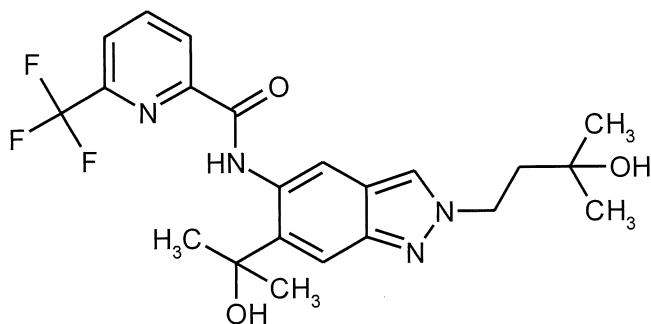
UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,02$ phút

MS (ESIpos): $m/z = 485$ ($M+H$)⁺

¹H-NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,63 (s, 6H), 2,26 - 2,42 (m, 2H), 2,99 (s, 3H), 3,06 - 3,16 (m, 2H), 4,55 (t, 2H), 5,96 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 8,33 - 8,48 (m, 3H), 8,73 (s, 1H), 12,37 (s, 1H).

Ví dụ 11

N-[2-(3-Hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(trifluoromethyl)pyridin-2-carboxamid



Phương pháp điều chế 1

705 mg (1,57 mmol) methyl 2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-5-([6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-4) ban đầu được nạp trong 10 ml THF và làm mát trong bể làm mát bằng nước đá. 2,6 ml (5,0 đương lượng) dung dịch metylmagie bromua 3M (trong dietyl ete) được bổ sung vào và hỗn hợp này được để cho khuấy trong khi làm mát bằng bể nước đá trong 1 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 4,5 giờ. Thêm 1 đương lượng dung dịch metylmagie bromua được bổ sung vào và hỗn hợp này được để cho khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20,5 giờ. Thêm 1 đương lượng dung dịch metylmagie bromua nữa được bổ sung vào và hỗn hợp này được để cho khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 22 giờ. Hỗn hợp phản ứng được phối trộn với dung dịch nước amoni clorua bão hòa, khuấy và chiết ba lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua, được lọc qua bộ lọc kị nước và được cô đặc. Quy trình này tạo ra 790 mg phần cặn mà được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Quy trình này tạo ra 234 mg hợp chất nêu ở đề mục và 164 mg phần đoạn sản phẩm mà được khuấy với dietyl ete. Sau khi lọc bằng cách hút tiếp theo là làm khô, thu được thêm 146 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,10$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 450,00.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1,14 (s, 6H), 1,61 (s, 6H), 1,99 - 2,08 (m, 2H), 4,42 - 4,55 (m, 3H), 5,93 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 8,15 (dd, 1H), 8,32 - 8,39 (m, 2H), 8,41 - 8,47 (m, 1H), 8,70 (s, 1H), 12,34 (s, 1H).

Phương pháp điều chế 2

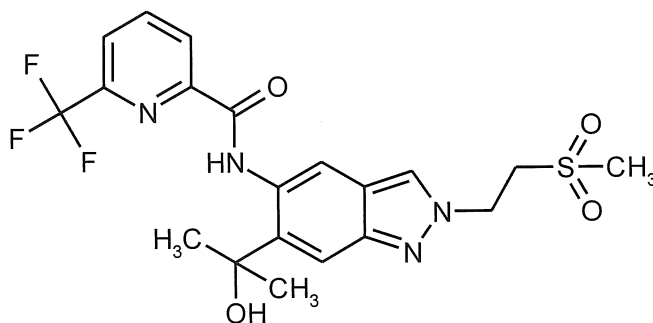
Hỗn hợp chứa 500 mg (1,37 mmol) N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (hợp chất trung gian 5-1), 569 mg kali cacbonat và 114 mg kali iodua trong 5 ml DMF được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. 344 mg (1,5 đương lượng) 4-bromo-2-metylbutan-2-ol được bổ sung vào và hỗn hợp này được đun nóng đến 100°C trong 2 giờ. Thêm 0,5 đương lượng 4-bromo-2-metylbutan-2-ol được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Hỗn hợp này được phối trộn với nước và chiết hai lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa và lọc qua màng

lọc kỵ nước và cô đặc. Phần còn lại được tinh chế bằng phương pháp tinh chế sắc ký cột trên silicagel (hexan/etyl axetat). Quy trình này tạo ra 100 mg phân đoạn sản phẩm mà được khuấy với dietyl ete. Chất rắn được lọc ra và làm khô. Thu được 60 mg hợp chất nêu ở đề mục.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,14 (s, 6 H), 1,61 (s, 6H), 1,99 - 2,07 (m, 2 H), 4,43 - 4,52 (m, 3 H) 5,94 (s, 1 H) 7,57 (s, 1 H) 8,15 (dd, 1H) 8,33 - 8,40 (m, 2 H), 8,42 - 8,48 (m, 1 H), 8,71 (s, 1 H), 12,35 (s, 1 H)

Ví dụ 12

N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[2-(metylsulphonyl)etyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



160 mg (0,44 mmol) N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (hợp chất trung gian 5-1) được tạo huyền phù cùng với 182 mg kali cacbonat và 36 mg kali iodua trong 1,0 ml DMF, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Sau đó, 123 mg 2-bromoetyl metyl sulphon (0,66 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat và các phần chiết được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Tinh chế phân cận bằng phương pháp HPLC điều chế tạo ra 20 mg hợp chất nêu ở đề mục.

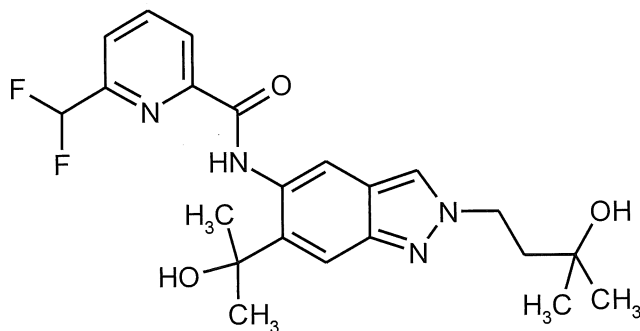
UPLC (Phương pháp A2): R_t = 1,01 phút;

MS (ESIpos): m/z = 471 ($M+H$) $^+$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,63 (s, 6 H), 2,90 (s, 3 H), 3,85 (t, 2 H), 4,86 (t, 2 H), 5,97 (s, 1 H), 7,59 (s, 1 H), 8,13 - 8,19 (m, 1 H), 8,37 (s, 1 H), 8,41 - 8,48 (m, 2 H), 8,74 (s, 1 H), 12,37 (s, 1 H).

Ví dụ 13

6-(Diflometyl)-N-[2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit



Phương pháp điều chế 1

Hỗn hợp chứa 250 mg 6-(diflometyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit (sản phẩm thô của hợp chất trung gian 5-2), 144 mg kali iodua và 239 mg kali cacbonat trong 2,5 ml DMF được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. 145 mg (0,87 mmol) 4-bromo-2-metylbutan-2-ol được bổ sung vào, hỗn hợp này được khuấy ở 110°C trong 3 giờ, thêm 96 mg 4-bromo-2-metylbutan-2-ol được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 110°C trong 4 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat và phần chiết được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bán bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Tiến hành tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (hexan/etyl axetat). Thu được 61 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): R_t = 1,00 phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 432,00.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,14 (s, 6H), 1,63 (s, 6H), 1,97 - 2,08 (m, 2H), 4,41 - 4,55 (m, 3H), 5,99 (s, 1H), 7,03 (t, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,94 - 8,00 (m, 1H), 8,24 - 8,38 (m, 3H), 8,71 (s, 1H), 12,49 (s, 1H).

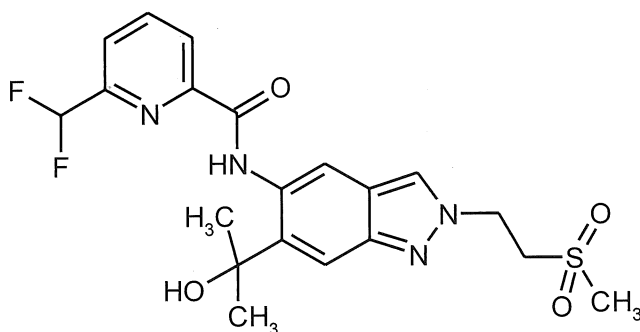
Phương pháp điều chế 2

Tương tự như quy trình điều chế hợp chất ví dụ 11 (Phương pháp điều chế 1), 3,00 g methyl 5-([6-(diflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl)amino)-2-(3-hydroxy-3-

methylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-11) được cho phản ứng với dung dịch metylmagie bromua 3M (trong dietyl ete). Sau khi tinh chế sản phẩm thô bằng cách khuấy với dietyl ete, lọc tiếp theo là phương pháp HPLC điều chế, thu được 1,37 g hợp chất nêu ở đề mục.

Ví dụ 14

6-(Diflometyl)-N-{6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-[2-(metylsulphonyl)etyl]-2H-indazol-5-yl}pyridin-2-carboxamit



Hỗn hợp chứa 250 mg 6-(diflometyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit (sản phẩm thô của hợp chất trung gian 5-2), 144 mg kali iodua và 239 mg kali cacbonat trong 2,5 ml DMF được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, 162 mg 2-bromoetyl metyl sulphon (0,87 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 110°C trong 3 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết hai lần bằng etyl axetat và phần chiết được rửa bằng dung dịch nước natri clorua bán bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế và các phân đoạn sản phẩm được tinh chế tiếp bằng phương pháp sắc ký cột trên silica gel (hexan/etyl axetat). Thu được 40 mg hợp chất nêu ở đề mục.

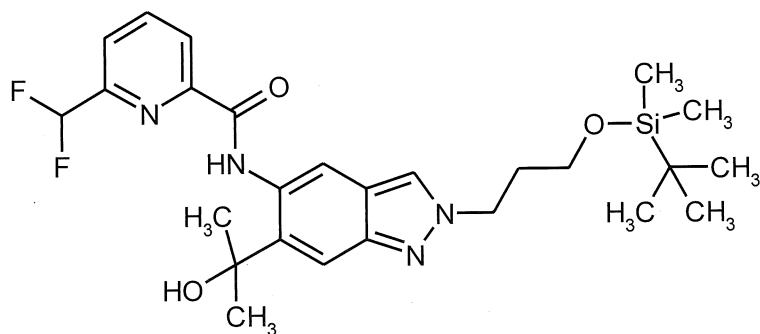
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,65 (s, 6H), 2,90 (s, 3H), 3,85 (t, 2H), 4,85 (t, 2H), 6,03 (s, 1H), 7,04 (t, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,98 (d, 1H), 8,25 - 8,36 (m, 2H), 8,43 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 12.52 (s, 1H).

Ví dụ 15

6-(Diflometyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypropyl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit

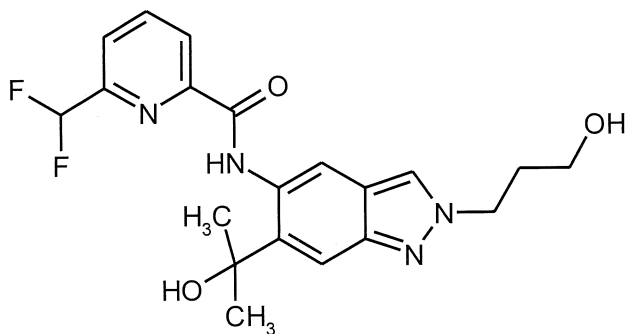
Giai đoạn A:

Điều chế N-[2-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(difluoromethyl)pyridin-2-carboxamid



Hỗn hợp chứa 250 mg 6-(difluoromethyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamid (hợp chất trung gian 5-2), 48 mg kali iodua và 239 mg kali cacbonat trong 2,5 ml DMF được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. 219 mg (0,87 mmol, 1,5 đương lượng) (3-bromopropoxy)(tert-butyl)dimetylsilan được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 110°C trong 3 giờ. Thêm 1 đương lượng (3-bromopropoxy)(tert-butyl)dimetylsilan được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 100°C trong 4 giờ. Nước được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết bằng etyl axetat và phần chiết được rửa bằng dung dịch nước natri clorua, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột (hexan/etyl axetat). Thu được 92 mg hợp chất nêu ở đề mục.

Giai đoạn B:



Tương tự như quy trình điều chế hợp chất ví dụ 6, Giai đoạn B, 92 mg N-[2-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-

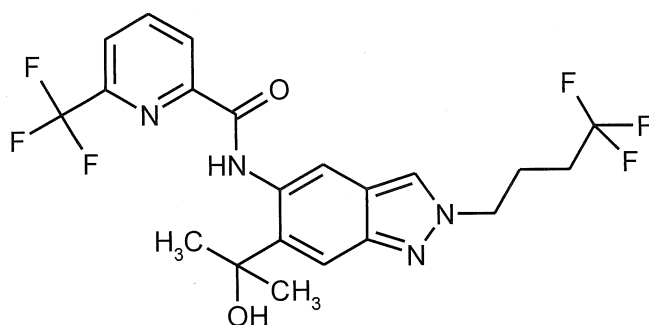
(diflometyl)pyridin-2-carboxamit được cho phản ứng với 0,53 ml dung dịch tetrabutylamoni florua 1M trong THF trong 1 giờ. Làm sạch bằng nước như trong Ví dụ 6 và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế tạo ra 46 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 0,92$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 404,00.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,64 (s, 6H), 2,05 (quin, 2H), 3,35 - 3,46 (m, 2H), 4,45 (t, 2H), 4,64 (t, 1H), 5,99 (s, 1H), 7,04 (t, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,95 – 7,99 (m, 1H), 8,25 - 8,36 (m, 3H), 8,73 (s, 1H), 12,50 (s, 1H).

Ví dụ 16

N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



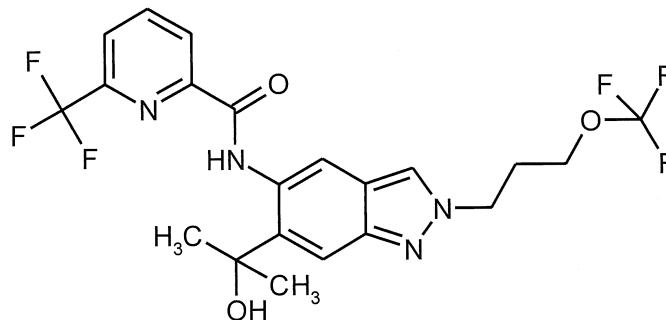
Hỗn hợp chứa 210 mg (0,58 mmol) N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (hợp chất trung gian 5-1) trong 3 ml DMF được phối trộn với 0,11 ml (0,87 mmol) 1,1,1-triflo-4-iodobutan và 239 mg kali cacbonat, và hỗn hợp này được khuấy ở 80°C trong 6 giờ. Sau khi bổ sung nước, hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Thu được 19 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,27$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 474,15.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,62 (s, 6H), 2,10 - 2,33 (m), 4,49 (t, 2H), 5,94 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 8,13 - 8,18 (m, 1H), 8,32 - 8,41 (m, 2H), 8,41 - 8,47 (m, 1H), 8,72 (s, 1H), 12,35 (s, 1H).

Ví dụ 17

N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(triflometoxy)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



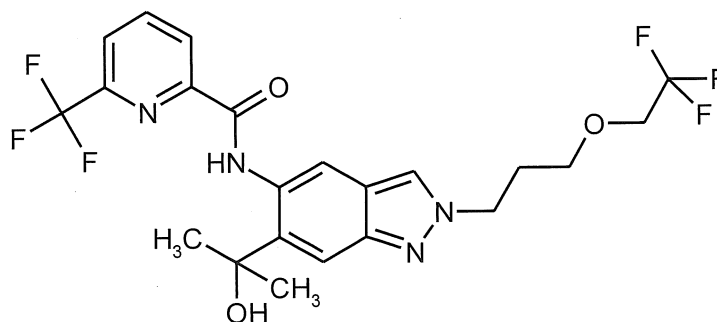
150 mg (0,33 mmol) N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (hợp chất trung gian 5-1) ban đầu được nạp trong 2 ml THF. 58 mg (0,40 mmol) 3-(triflometoxy)propan-1-ol, 131 mg triphenylphosphine và 71 μ l diisopropyl azodicarboxylat (DIAD, CAS 2446-83-5) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 19 giờ. 0,83 ml dung dịch natri hydroxit (2M) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 40°C trong 5 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và chiết ba lần bằng etyl axetat, và các pha hữu cơ kết hợp được cô đặc và tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Thu được 16 mg hợp chất nêu ở đề mục dưới dạng sản phẩm thô,

UPLC-MS (Phương pháp A2): R_t = 1,26 phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 490,14.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6 , các tín hiệu chọn lọc): δ [ppm]= 1,61 (s, 6H), 1,84 (d, 1H), 2,32 (quint., 2H), 4,08 (t, 2H), 4,51 (t, 2H), 7,58 (s, 1H), 8,15 (d, 1H), 8,31 – 8,39 (m, 2H), 8,44 (d, 1H), 8,72 (s, 1H), 12,35 (s, 1H).

Ví dụ 18

N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(2,2,2-trifloetoxi)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



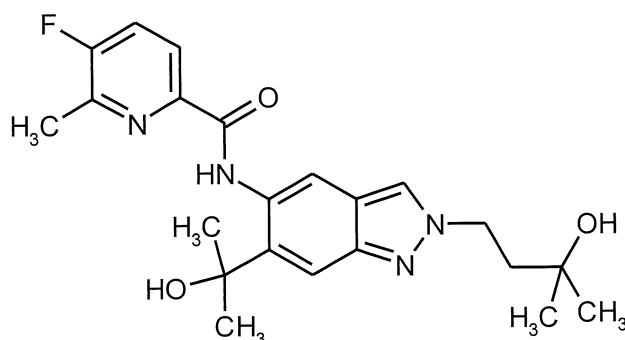
Tương tự như quy trình điều chế hợp chất ví dụ 11 (Phương pháp điều chế 1), 52 mg (0,10 mmol) methyl 2-[3-(2,2,2-trifluoroethoxy)propyl]-5-([6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]carbonyl)amino)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-10) trong 3 ml THF được cho phản ứng với $2 \times 171 \mu\text{l}$ dung dịch magie bromua 3M trong diethyl ete. Tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế tạo ra 12 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A1): $R_t = 1,25$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 504,16.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1,63 (s, 6H), 2,20(quin, 2H), 3,58(t, 2H), 4,05(q, 2H), 4,47(t, 2H), 5,94(s, 1H), 7,58 (s, 1H), 8,15 (dd, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,36 (t, 1H), 8,45(d, 1H), 8,73 (s, 1H), 12,36 (s, 1H).

Ví dụ 19

5-fluoro-N-[2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-methylpyridin-2-carboxamid



228 mg (0,31 mmol) methyl 5-{[(5-fluoro-6-methylpyridin-2-yl)carbonyl]amino}-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-8) ban đầu được nạp trong 4,5 ml THF và làm mát bằng bể làm mát bằng nước đá. 0,63 ml dung dịch metylmagie bromua 3M (trong diethyl ete) được bổ sung vào và hỗn hợp này được

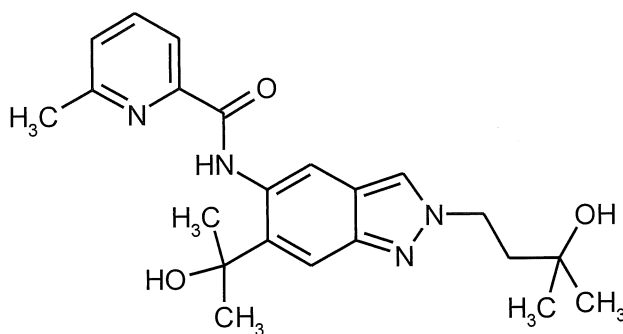
để cho khuấy trong khi làm mát bằng bể nước đá trong 2 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 21 giờ. Hỗn hợp phản ứng được phối trộn với dung dịch nước ammoni clorua bão hòa và chiết ba lần bằng ethyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Thu được 82 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,03$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 414,21.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,13 (s, 6H), 1,63 (s, 6H), 1,99 - 2,05 (m, 2H), 2,55 - 2,59 (m, 3H), 4,42 - 4,50 (m, 3H), 5,95 (s, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,83 (t, 1H), 8,05 (dd, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 12,33 (s, 1H).

Ví dụ 20

N-[2-(3-Hydroxy-3-methylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-methylpyridin-2-carboxamid



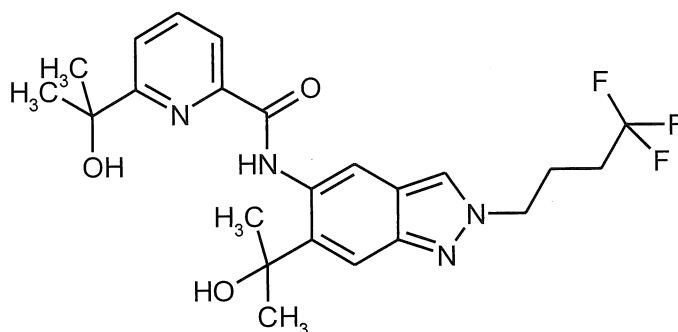
278 mg (0,48 mmol) methyl 2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-5-[[6-methylpyridin-2-yl]carbonyl]amino}-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-9) ban đầu được nạp trong 5,0 ml THF và làm mát bằng bể làm mát bằng nước đá. 0,97 ml dung dịch methylmagie bromua 3M (trong diethyl ete) được bổ sung vào và hỗn hợp này được để cho khuấy trong khi làm mát bằng bể nước đá trong 2 giờ và ở nhiệt độ trong phòng trong 20,5 giờ. Thêm 0,48 ml dung dịch methylmagie bromua 3M được bổ sung vào và hỗn hợp này được để cho khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 67 giờ. Hỗn hợp này được phối trộn với dung dịch nước ammoni clorua bão hòa và chiết ba lần bằng ethyl axetat, và các phần chiết được rửa bằng natri clorua solution, lọc qua màng lọc kỵ nước và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế. Thu được 111 mg hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 0,97$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 396,22.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,15 (s, 6H), 1,64 (s, 6H), 2,00 - 2,08 (m, 2H), 2,61 (s, 3H), 4,41 - 4,59 (m, 3H), 5,92 (s, 1H), 7,50 (dd, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,90 - 7,99 (m, 2H), 8,33 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 12,39 (s, 1H).

Ví dụ 21

6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit



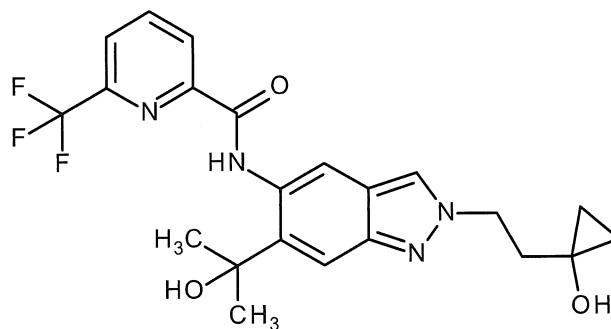
Dung dịch chứa 72 mg (0,16 mmol) methyl 5-([6-(2-hydroxypropan-2-yl)pyridin-2-yl]cacbonyl)amino)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-6-carboxylat (hợp chất trung gian 4-7) trong 10 ml THF được làm mát bằng bể làm mát bằng nước đá/nước. 0,26 ml dung dịch metylmagie bromua 3M trong diethyl ete được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 2 giờ và sau đó ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ. Thêm 1 đương lượng dung dịch metylmagie bromua 3M được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Dung dịch nước amoni clorua bão hòa được bổ sung vào, hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat và các phần chiết được rửa bằng dung dịch natri clorua và cô đặc. Phương pháp HPLC điều chế tạo ra 22 mg (31% so với lý thuyết) hợp chất nêu ở đề mục.

UPLC-MS (Phương pháp A2): $R_t = 1,15$ phút (bộ dò UV: TIC), khối lượng phát hiện được 464,20.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 1,56 (s, 6H), 1,64 (s, 6H), 2,07 - 2,34 (m, 4H), 4,49 (t, 2H), 5,32 (s, 1H), 6,05 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,87 (dd, 1H), 7,99 - 8,05 (m, 2H), 8,35 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 12,45 (s, 1H).

Ví dụ 22

N-{2-[2-(1-Hydroxycyclopropyl)ethyl]-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit



250 mg (0,69 mmol) N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit (hợp chất trung gian 5-1) ban đầu được nạp trong 5 ml DMSO. 159 mg (0,96 mmol) 1-(2-bromoethyl)xyclopropanol, 285 mg kali cacbonat và 171 mg kali iodua được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở 100°C trong 5 giờ. Nước được bổ sung vào và hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat. Các pha hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri clorua, lọc qua bộ lọc kị nước và cô đặc. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế (cột: Waters XBridge C18 5 μ 100x30mm, chất rửa giải A: nước + 0,1% thể tích axit formic (99%), chất rửa giải B: axetonitril). Đông khô tạo ra 45 mg hợp chất nêu ở đề mục.

¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 0,18 - 0,22 (m, 2H), 0,48 - 0,52 (m, 2H), 1,62 (s, 6H), 2,08 (t, 2H), 4,54 - 4,60 (m, 2H), 5,36 (s, 1H), 5,96 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 8,16 (dd, 1H), 8,34 - 8,39 (m, 2H), 8,45 (d, 1H), 8,72 (s, 1H), 12,36 (s, 1H).

Đánh giá hiệu quả sinh lý

Thử nghiệm IRAK4 kinaza

Hoạt tính ức chế IRAK4 của các hợp chất theo sáng chế được xác định trong thử nghiệm IRAK4 TR-FRET (TR-FRET = Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer - truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang phân giải thời gian) được mô tả sau đây.

Protein dung hợp tái tổ hợp từ GST (glutathion S-transferaza) đầu tận cùng N và IRAK4 người, được biểu hiện trong các tế bào côn trùng đã chuyển nhiễm baculovirut (Hi5, BTI-TN-5B1-4, dòng tế bào mua được từ hãng Invitrogen, catalogue No. B855-02) và được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực, được sử dụng làm enzym. Nền sử dụng cho phản ứng kinaza là peptit biotin-Ahx-KKARFSRFAGSSPSQASFAEPG biotinyl hóa (tận cùng C ở dạng amit) có thể được mua, ví dụ, từ Biosyntan GmbH (Berlin-Buch).

Để thử nghiệm, 11 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 20 μ M đến 0,073nM được điều chế từ dung dịch DMSO 2mM chứa hợp chất thử nghiệm. 50nl dung dịch tương ứng được hút bằng pipet vào trong đĩa vi chuẩn độ 384 lỗ thể tích nhỏ màu đen (Greiner Bio-on, Frickenhausen, Germany), 2 μ l dung dịch chứa IRAK4 trong dung dịch đệm thử nghiệm [50mM HEPES pH 7,5, 5mM MgCl₂, 1,0mM dithiothreitol, 30 μ M natri orthovanadat hoạt hóa, 0,1% (khối lượng/thể tích) của gama-globulin bò (BGG) 0,04% (thể tích/thể tích) nonidet-P40 (Sigma)] được bổ sung vào đó và hỗn hợp được ủ trong thời gian 15 phút để cho phép liên kết sơ bộ giữa các hợp chất với enzym trước khi phản ứng kinaza. Sau đó, phản ứng kinaza được khởi đầu bằng việc bổ sung 3 μ l dung dịch chứa adenosin triphosphat (ATP, 1,67mM = nồng độ cuối trong 5 μ l thể tích thử nghiệm: 1 mM) và cơ chất peptit (0,83 μ M = nồng độ cuối trong 5 μ l thể tích thử nghiệm: 0,5 μ M) trong dung dịch đệm thử nghiệm, và hỗn hợp tạo ra được ủ ở nhiệt độ 22°C trong thời gian phản ứng 45 phút. Nồng độ của IRAK4 được điều chỉnh theo hoạt tính tương ứng của enzym và được thiết lập theo cách sao cho thử nghiệm được tiến hành thực hiện trong phạm vi tuyến tính. Các nồng độ điển hình theo thứ tự khoảng 0,2 nM. Phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung 5 μ l dung dịch chứa các chất phản ứng phát hiện TR-FRET [0,1 μ M streptavidin-XL665 (Cisbio Bioassays; France, catalogue No. 610SAXLG) và 1,5 nM kháng thể kháng phosphoserin [Merck Millipore, "STK Antibody", catalogue No. 35-002] và 0,6 nM kháng thể kháng IgG của chuột đánh dấu bằng LANCE EU-W1024 (Perkin-Elmer, mã số sản phẩm AD0077, theo cách khác có thể sử dụng kháng thể kháng IgG của chuột đánh dấu bằng terbium cryptate từ Cisbio Bioassays) trong dung dịch nước EDTA (100mM EDTA, 0,4% [khối lượng/thể tích] albumin huyết thanh bò [BSA] trong 25mM HEPES pH 7,5).

Hỗn hợp tạo ra được ủ ở nhiệt độ 22°C trong thời gian 1 giờ để cho phép hình thành phức giữa cơ chất biotinyl hóa phosphoryl hóa và các chất phản ứng phát hiện. Sau đó, lượng cơ chất phosphoryl hóa được đánh giá bằng cách xác định mức truyền năng lượng cộng hưởng từ kháng thể kháng IgG của chuột đánh dấu bằng chelat europi sang streptavidin-XL665. Về điểm này, sự phát huỳnh quang tại bước sóng 620nm và 665nm được xác định sau khi kích thích tại bước sóng 350nm trong dụng cụ xác định TR-FRET, ví dụ dụng cụ Rubystar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) hoặc Viewlux (Perkin-Elmer). Tỷ lệ phát xạ tại bước sóng 665nm và 622nm được lấy làm số đo của lượng cơ chất phosphoryl hóa. Dữ liệu được chuẩn hóa (phản ứng enzym không có hợp chất thử nghiệm = ức chế 0%; tất cả các thành phần thử nghiệm khác nhưng không có enzym = ức chế 100%). Thông thường, các chất thử nghiệm được phân tích trên cùng đĩa vi chuẩn độ tại 11 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 20 μ M đến 0,073 nM (20 μ M, 5,7 μ M, 1,6 μ M, 0,47 μ M, 0,13 μ M, 38 nM, 11 nM, 3,1 nM, 0,89 nM, 0,25 nM và 0,073 nM). Các dung dịch pha loãng hàng loạt được điều chế trước khi thử nghiệm (từ 2 mM đến 7,3 nM trong DMSO 100%) bằng cách pha loãng hàng loạt. Các giá trị IC₅₀ được tính toán bằng cách khớp 4 thông số.

Bảng 1: Giá trị IC₅₀ của các hợp chất ví dụ trong thử nghiệm phân tích IRAK4 kinaza

Ví dụ	IC ₅₀ [nM]
1	30,6
2	135,6
3	7,2
4	52,7
5	264,5
6	35,7
7	867,3
8	15,0
9	103,8
10	18,5
11	3,4
12	10,7
13	1,3
14	10,8
15	12,3

Ví dụ	IC ₅₀ [nM]
16	21,5
17	36,0
18	47,5
19	8,9
20	13,3
21	117,2
22	3,7

Hoạt tính ức chế của các hợp chất có công thức chung (III) theo sáng chế đối với IRAK4 được xác định tương tự trong thử nghiệm IRAK4 TR-FRET được mô tả trên đây. Các giá trị sau đây được đưa ra làm ví dụ: hợp chất trung gian 4-2 với $IC_{50} = 21,7$ nM, hợp chất trung gian 4-3 với $IC_{50} = 13,0$ nM và hợp chất trung gian 4-4 với $IC_{50} = 6,2$ nM.

Sự tiết TNF- α trong các tế bào THP-1

Thử nghiệm này được thiết kế để thử nghiệm các chất về khả năng ức chế của chúng đối với sự tiết TNF- α (yếu tố hoại tử khối u alpha) trong các tế bào THP-1 (dòng tế bào bệnh bạch cầu cấp loại tế bào đơn nhân to ở người). TNF- α là một xytokin có liên quan đến các quá trình viêm. Trong xét nghiệm này, sự tiết TNF- α được khởi phát bằng cách ủ với lipopolysaccharit vi khuẩn (LPS).

Các tế bào THP-1 được giữ trong giống nuôi cấy tế bào dạng huyền phù liên tục [môi trường RPMI 1460 với L-Glutamax (Gibco, Cat. No, 61870-044) có bổ sung huyết thanh bào thai bê (FCS) 10% (Invitrogen, Cat. No, 10082-147), 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Cat. No. 15140-114)] và không vượt quá nồng độ tế bào 1×10^6 tế bào/ml. Thử nghiệm được thực hiện trong môi trường nuôi cấy tế bào (môi trường RPMI 1460 với L-Glutamax có bổ sung FCS 10%).

Trong mỗi trường hợp, 2-2,5 μ l huyền phù tế bào (tương ứng với 4000 tế bào) mỗi giếng được phân phối vào đĩa thử nghiệm 384 giếng (Greiner, Cat. No. 784076), trong từng giếng đã hòa tan từ 40-50 nl chất trong DMSO 100%. Việc này được thực hiện bằng 10 nồng độ khác nhau trong khoảng từ 20 μ M đến 0,073 nM đối với mỗi chất. Tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. Sau đó, 2-2,5 μ l dung dịch LPS 0,1 μ g/ml (Sigma, *Escherichia coli* 055:B5, Cat. No. L5418) đã hòa tan trong môi trường nuôi cấy tế bào (nồng độ cuối 0,05 μ g/ml) được phân phối vào trong mỗi lỗ. Để làm đối chứng trung tính, các tế bào được xử lý bằng 0,05 μ g/ml LPS và 1% DMSO và để làm đối chứng ức chế, các tế bào chỉ được xử lý bằng 1% DMSO.

Các đĩa được ly tâm với tốc độ 80 g trong thời gian 30 giây và được ủ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ và 95% độ ẩm môi trường trong thời gian 17 giờ. Lượng TNF- α được xác định sử dụng bộ kit phát hiện TNF-alpha HTRF (Cisbio, Cat. No. 62TNFPEB/C). Cuối thử nghiệm này, trong mỗi trường hợp, 2 μ l dung dịch phát hiện chứa thể tiếp hợp

kháng TNF- α -XL665 và thể tiếp hợp kháng TNF- α -cryptate, được hòa tan theo hướng dẫn của nhà sản xuất trong dung dịch đệm hoàn nguyên, được bổ sung vào để thử nghiệm huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence). Sau khi bổ sung, hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ hoặc ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau đó, các tín hiệu được đọc tại 620/665nm sử dụng dụng cụ xác định cho phép thực hiện HTRF như dụng cụ BMG PheraStar.

Hoạt tính của các chất được biểu thị ở dạng tỷ lệ giữa đối chứng trung tính và đối chứng ức chế tính theo %. Các giá trị IC₅₀ được tính toán bằng cách khớp 4 thông số.

Bảng 2: Giá trị IC₅₀ của các hợp chất ví dụ về khả năng tiết TNF- α trong các tế bào THP-1

Ví dụ	IC ₅₀ [μ M]
1	1,0
2	15,1
3	0,7
4	5,6
5	5,4
6	0,9
7	16,4
8	1,0
9	6,5
10	1,0
11	0,2
12	0,3
13	0,1
14	0,2
15	0,2
16	0,2
17	0,5
18	0,3
19	0,1
20	0,2
21	1,8

Sự sản sinh xytokin do LPS (lipopolysacarit) kích thích *in vitro* trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) của người

Tác dụng của hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế lên sự sản sinh xytokin do kích thích ở các PBMC của người được khảo sát. Ở đây, sự sản sinh xytokin được kích thích bằng LPS, một phối tử TLR4, phối tử này dẫn đến sự hoạt hóa đường truyền tín hiệu qua trung gian IRAK4.

Các PBMC của người thu được từ máu toàn phần của người đã được chống đông. Nhằm mục đích này, 15 ml Ficoll-Paque (Biochrom, Cat. No. L6115) đầu tiên được chuyển bằng pipet vào các ống Leucosep và 20 ml máu người được bổ sung vào. Sau khi ly tâm máu ở tốc độ 800g trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, huyết tương bao gồm cả tiểu cầu được lấy ra và loại bỏ. PBMC được chuyển vào các ống ly tâm và được kết hợp với dung dịch nước muối đệm phosphat PBS (phosphate-buffered saline) (Gibco, Cat. No. 14190). Huyền phù tế bào được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng với tốc độ 250g trong thời gian 10 phút và lớp nổi trên bề mặt được lấy ra. PBMC được tái huyền phù trong môi trường đầy đủ (RPMI 1640, không có L-glutamin (PAA, Cat. No. E15-039), FCS 10%; 50 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin (PAA, Cat. No. P11-010) và 1% L-glutamin (Sigma, Cat. No. G7513)).

Thử nghiệm cũng được thực hiện trong môi trường đầy đủ. Các PBMC được gieo vào các đĩa 96 giếng với mật độ tế bào $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng. Các hợp chất theo sáng chế được pha loãng hàng loạt trong thể tích DMSO 100% không đổi và được sử dụng trong thử nghiệm với 8 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 10 µM đến 3 nM, sao cho nồng độ DMSO cuối cùng là DMSO 0,4%. Trước khi thực sự kích thích, các tế bào được ủ sơ bộ với nó trong thời gian 30 phút. Để kích thích sự tiết xytokin, các tế bào được kích thích bằng 0,1 µg/ml LPS (Sigma, Cat. No. L2887) trong thời gian 24 giờ. Khả năng sống của tế bào được xác định sử dụng thử nghiệm phát quang CellTiter-Glo (Promega, Cat. No. G7571 (G755/G756A)) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lượng TNF-α tiết ra trong lớp bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được xác định sử dụng bộ dụng cụ nuôi cấy mô Human ProInflammatory 9-Plex Tissue Culture Kit (MSD, Cat. No. K15007B) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ, hợp chất ví dụ 11 và hợp chất ví dụ 12 có hoạt tính ≤ 1 µM.

Sự tiết interleukin (IL)-23 do TLR-4/TLR-7 kích thích *in vitro* của tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC) của người

Tác dụng của các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế đến sự sản sinh do kích thích của các xytokin gây viêm IL-23 đóng vai trò chính trong sự tạo thành các tế bào TH-17 được khảo sát trong các tế bào DC người. Đã cho rằng các tế bào TH-17 đóng vai trò quyết định trong sinh bệnh học của các rối loạn như viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh Bekhterev (viêm cột sống dính khớp) hoặc đa xơ cứng (Lubberts, Nat. Rev. Rheumatol., 2015; Marinoni et al., Auto. Immun. Highlights, 2014; Isailovic et al., J. Autoimmun., 2015; Staschke et al., J Immunol., 2009). Để phát hiện tác dụng của các hợp chất theo sáng chế đến sự sản sinh IL-23, các bạch cầu đơn nhân sơ cấp của người (phân lập được từ PBMC người bằng cách sử dụng phương pháp tách từ tính [Miltenyi Biotech, Monocyte Isolation Kit, Cat. No. 130-091-153] và bằng cách bổ sung các yếu tố sinh trưởng (GM-CSF người tái tổ hợp [PeproTech, Cat. No. 300-03] và IL-4 [PeproTech, Cat. No. 200-04]) trong môi trường đầy đủ (VLE (lượng nội độc tố rất thấp) RPMI 1640 [Biochrom AG, Cat. No. FG1415], 10% huyết thanh thai bò (FBS) [Gibco, Cat -No. 10493-106]; 50 μ M β -mercaptoethanol (Gibco, Cat. No. 31350], 50 U/ml penicillin và streptomycin [Gibco, Cat. No. 15140-114]) được biệt hóa trong giống nuôi cấy trong 6 ngày thành DC. Sau khi các tế bào DC đã được thu hoạch, chúng được tạo huyền phù lại trong môi trường đầy đủ và gieo với mật độ tế bào 2×10^5 tế bào/giếng vào đĩa 96 giếng (Costar, Cat. No. 3599). Các hợp chất theo sáng chế được pha loãng hàng loạt trong thể tích DMSO 100% không đổi và được sử dụng trong thử nghiệm với 9 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 10 μ M đến 1 nM. Ở đây, đảm bảo rằng nồng độ DMSO có mặt luôn là DMSO 0,1% đối với mỗi nồng độ trong số 9 nồng độ được dùng. Các DC được ủ trước trong 30 phút với các hợp chất theo sáng chế. Sau đó, các DC được kích thích để tạo ra IL-23 bằng cách bổ sung 10 ng/ml LPS (Sigma, *Escherichia coli* serotype 0127:B8, Cat. No. L3129) (phối tử TLR4) và 2,5 μ g/ml phối tử TLR-7/8 R848 (Invivogen, Cat. No. tlrl-r848-5), cả hai phối tử này hoạt hóa đường truyền tín hiệu qua trung gian IRAK4, trong máy ủ (37°C, độ ẩm tương đối 95%, 5% CO₂) trong 24 giờ. Sau khi ủ trong 24 như vậy, thu lấy dịch nổi và phân tích bằng bộ thử nghiệm hIL-23 ELISA có bán trên thị trường (eBiosciences, Cat. No. 88-7237-88),

tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả ức chế IL-23 trong các DC người được thể hiện làm ví dụ đối với hợp chất ví dụ 12 trong Fig. 1.

Sự sản sinh IFN α do kích thích TLR-7/8 hoặc TLR-9 *in vitro* bởi tế bào đuôi gai tương bào người (pDC)

Với sự hỗ trợ của thử nghiệm này, tác dụng của các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế đến sự sản sinh IFN α (interferon-alpha) trong pDC người, một xytokin chính trong sinh bệnh học của bệnh lupus ban đỏ hệ thống (Mathian et al., Arthritis Rheum, 2009; Crow M.K., Rheum Dis Clin N Am, 2010) có thể được thử nghiệm. Nhằm mục đích này, các tế bào PBMC người được phân lập từ máu toàn phần như mô tả trên đây và các DC tương bào (pDC) được phân lập từ đó bằng cách sử dụng kit tách tế bào có bán trên thị trường (Miltenyi Biotech, Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II, Cat. No. 130-097-415). Các pDC thu được được tạo huyền phù lại trong môi trường đầy đủ (RPMI 1640 + GlutaMax [Gibco, Cat. No. 61870-010] có bổ sung 10% FBS [Gibco, Cat. No. 10493-106] và 50 U penicillin/streptomycin [Gibco, Cat. No. 15140-114]) và gieo ở mật độ tế bào 5×10^4 tế bào/giếng trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng (Costar, Cat. No. 3599). Các hợp chất theo sáng chế được pha loãng hàng loạt trong thể tích DMSO 100% không đổi và được sử dụng trong thử nghiệm với 9 nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 10 μ M đến 1 nM. Đảm bảo rằng nồng độ DMSO có mặt luôn là DMSO 0,1% đối với mỗi nồng độ trong số 9 nồng độ được thử nghiệm. Các pDC được ủ trước trong 30 phút với các hợp chất theo sáng chế. Các pDC được kích thích bằng phối tử TLR7/8 (imiquimod, R837, Invivogen, Cat. No. tlrl-imq) hoặc bằng phối tử TLR-9 (CPG-A, ODN2216, Invivogen, Cat. No. tlrl-2216-1) và việc này dẫn đến sự hoạt hóa các đường truyền tín hiệu qua trung gian IRAK4. Sau khi ủ trong 24 giờ, dịch nuôi cấy tế bào được lấy ra và phân tích bằng cách sử dụng bộ thử nghiệm ELISA IFN α người (IFNalpha Multi-Subtype ELISA Kit, pbl Assay Science, Cat. No. 41105-1). Kết quả ức chế IFN α trong các DC tương bào người được thể hiện làm ví dụ đối với hợp chất ví dụ 12 trong Fig. 2.

Mô hình viêm qua trung gian TLR *in vivo*

Các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế được khảo sát về hiệu quả *in vivo* của chúng trong mô hình viêm qua trung gian *in vivo* TLR. Mô hình cơ học này đặc

biệt thể hiện tác dụng tiềm năng của các hợp chất theo sáng chế lên các rối loạn qua trung gian TLR4 khi mô hình viêm qua trung gian LPS được sử dụng. Trong mô hình này, chuột nhắt cái Balb/c (khoảng 8 tuần tuổi; Charles River Laboratories, Germany) được phân thành các nhóm gồm 5 động vật mỗi nhóm. Nhóm đối chứng được xử lý bằng chất mang, trong đó hợp chất đã được hòa tan (chất mang) và cũng được xử lý bằng chất mang, trong đó LPS đã được hòa tan. Các nhóm điều trị bằng hợp chất cũng như nhóm đối chứng dương được cho dùng 0,2 mg LPS/kg thể trọng (Sigma, Cat. No. L4391) (lipopolysaccharit từ *E. coli* 0111:B4) trong màng bụng (i.p.). Ngoài ra, nhóm đối chứng dương được xử lý bằng thể mang hợp chất mô tả ở trên. Hợp chất được sử dụng theo đường uống 16 giờ trước khi kích thích gây viêm bằng cách sử dụng LPS. Để khảo sát tác dụng của hợp chất theo sáng chế lên quá trình viêm, mẫu máu được lấy từ động vật sau thời gian 1,5 giờ. Nồng độ của các xytokin cụ thể trong huyết tương được xác định bằng bộ kit Mouse ProInflammatory 7-Plex Tissue Culture (MSD, Cat. No. K15012B) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các chất ức chế IRAK4 là hữu hiệu trong mô hình viêm qua trung gian TLR. Fig. 3 thể hiện lượng TNF- α trong huyết tương, mà giảm theo cách phụ thuộc liều khi sử dụng hợp chất ví dụ 11 so với nồng độ do LPS kích thích.

Mô hình viêm qua trung gian IL-1 β *in vivo*

Để đánh giá hiệu quả tiềm năng của các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế trong các rối loạn qua trung gian IL-1 β , IL-1 β được sử dụng theo đường trong màng bụng cho chuột cái Balb/c (khoảng 8 tuần tuổi, Charles River Laboratories, Germany) và tác dụng của các hợp chất theo sáng chế lên sự tiết xytokin qua trung gian IL-1 β được khảo sát. Mỗi nhóm có 5 động vật. Nhóm đối chứng được điều trị bằng chất dẫn dùng để hòa tan hợp chất và IL-1 β . Các nhóm điều trị bằng hợp chất và nhóm đối chứng dương mỗi nhóm được cho sử dụng 90 μ g IL-1 β /kg thể trọng trong màng bụng. (R&D, Cat. No. 401-ML/CF). Hợp chất hoặc chất dẫn của nó ở nhóm đối chứng dương được sử dụng trước khi dùng IL-1 β 6 giờ. 2 giờ sau khi dùng IL-1 β , TNF- α được xác định trong huyết tương phân lập được từ máu bằng Mouse ProInflammatory 7-Plex Tissue Culture Kit (MSD, Cat. No. K15012B) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc sử dụng IL-1 β dẫn đến nồng độ TNF- α trong huyết tương tăng mà bị ức chế bằng cách điều trị bằng hợp chất ví dụ 11 và 12. Quy trình này được minh họa trên Fig. 4.

Mô hình bệnh viêm khớp do tá được gây ra *in vivo*

Để xác định hoạt tính kháng viêm của các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế, các hợp chất này được khảo sát về hiệu quả *in vivo* của chúng trong mô hình bệnh viêm khớp. Nhằm mục đích này, mỗi chuột cống Lewis đực (khoảng 100-125 g, Charles River Laboratories, Germany) được cho sử dụng 100 µl dung dịch tá được Freund đầy đủ (CFA) (*M. tuberculosis* H37Ra [Difo Lab, Cat. No. -231141] hòa tan trong tá được Freund không đầy đủ [Difco Lab, Cat. No. -263910]) dưới da ở cuống đuôi vào ngày 0. Mỗi nhóm có n = 8 chuột. Thử nghiệm có cả nhóm đối chứng khỏe mạnh và nhóm đối chứng mắc bệnh. Mỗi nhóm đối chứng được điều trị qua đường miệng chỉ bằng chất dẫn của hợp chất thử nghiệm. Tiến hành điều trị với liều hợp chất thử nghiệm khác nhau theo cách phòng ngừa, tức là bắt đầu từ ngày 0, bằng cách dùng qua đường miệng. Vào ngày 0, tình trạng ban đầu của các động vật được xác định thêm về mặt điểm hoạt động của bệnh (đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm khớp dựa trên hệ thống điểm). Ở đây, các điểm được chấm theo mức độ viêm khớp từ 0 đến 4 về sự có mặt của ban đỏ bao gồm sưng khớp (0 = không có; 1 = nhẹ; 2 = vừa phải; 3 = rõ ràng; 4 = nặng) đối với cả hai chân sau và cộng lại. Để xác định hiệu quả kháng viêm của các hợp chất, hoạt động của bệnh ở các chuột được tính điểm bằng cách chấm điểm hoạt động của bệnh bắt đầu từ ngày 8, khi mà chuột đầu tiên thể hiện các dấu hiệu của bệnh viêm khớp, và sau đó là 3 lần một tuần, cho đến ngày kết thúc (ngày 20). Tiến hành phân tích thống kê bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) và bằng cách so sánh với nhóm đối chứng bằng phương pháp phân tích nhiều so sánh (kiểm định Dunnett).

Việc sử dụng CFA dưới da ở chuột cống dẫn đến bệnh viêm khớp cấp với biểu hiện viêm khớp rõ ràng ở chuột. Bệnh viêm khớp đã gây ra này bị ức chế bởi việc điều trị bằng hợp chất ví dụ 11. Quy trình này được minh họa trên Fig. 5.

Mô hình bệnh viêm khớp do kháng thể collagen gây ra ở chuột nhắt

Hiệu quả kháng viêm của các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế được kiểm tra trong mô hình bệnh viêm khớp ở chuột nhắt. Nhằm mục đích này, vào ngày 0, mỗi chuột nhắt Balb/c cái (khoảng 9 tuần tuổi, Charles River Laboratories, Kingston, Canada) được tiêm trong tĩnh mạch 200 µl hỗn hợp kháng thể collagen (10 mg/ml; ArthritoMab, MD Bioproducts) vào tĩnh mạch đuôi (trừ nhóm đối chứng khỏe mạnh

trong nghiên cứu). Vào ngày 6, mỗi chuột này được tiêm tiếp 200 μ l LPS trong màng bụng. Mỗi nhóm có $n = 10$ chuột nhất. Thử nghiệm có cả nhóm đối chứng khỏe mạnh và nhóm đối chứng mắc bệnh. Mỗi nhóm đối chứng được điều trị qua đường miệng chỉ bằng chất dẫn của hợp chất thử nghiệm. Tiến hành điều trị với liều hợp chất thử nghiệm khác nhau theo cách phòng ngừa, tức là bắt đầu từ ngày 0, bằng cách dùng qua đường miệng. Trong toàn bộ khóa điều trị, mức độ của bệnh được tính điểm dựa trên hệ thống chấm điểm đối với hoạt động của bệnh trên cả bốn chân. Theo hệ thống chấm điểm này, chân khỏe mạnh được chấm không điểm, trong khi đó điểm từ 1 [viêm nhẹ, ví dụ, viêm ở (các) ngón chân] đến 4 [viêm nặng trải rộng trên toàn bộ chân] được chấm trong từng trường hợp đối với mức độ viêm khớp cụ thể mà đã phát sinh từ các nhóm chân qua khớp bàn chân đến khớp mắt cá chân, như được giải thích như sau:

- 0 = bình thường
- 1 = ban đỏ và sưng nhẹ giới hạn ở cổ chân hoặc mắt cá chân hoặc ngón chân
- 2 = ban đỏ và sưng nhẹ trải rộng từ mắt cá chân đến xương bàn chân (2 đoạn)
- 3 = ban đỏ và sưng vừa trải rộng từ mắt cá chân đến không quá các khớp bàn chân
- 4 = ban đỏ và sưng nặng bao quanh xương bàn chân, bàn chân và ngón chân

Đối với thông số này, tình trạng ban đầu được xác định một ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm (ngày -1) và điểm hoạt động của bệnh sau đó được tính ba lần một tuần từ ngày 8 trở đi. Tiến hành phân tích thống kê bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) và bằng cách so sánh với nhóm đối chứng bằng phương pháp phân tích nhiều so sánh (kiểm định Dunnett).

Việc sử dụng hỗn hợp kháng thể collagen đường tĩnh mạch bao gồm sử dụng LPS trong màng bụng sau đó ở chuột nhất dẫn đến bệnh viêm khớp cấp với biểu hiện viêm khớp rõ ràng. Bệnh viêm khớp đã gây ra này bị ức chế bởi việc điều trị bằng hợp chất ví dụ 12. Quy trình này được minh họa trên Fig. 6.

Mô hình chuột nhất NASH *in vivo*

Để gây ra NASH trong thực nghiệm, 200 μ g streptozotocin (STZ; Sigma-Aldrich, USA) được tiêm dưới da vào mỗi chuột trong số 45 chuột nhất C57BL/6 đực 2 ngày

tuổi. Bắt đầu từ 4 tuần tuổi, các chuột này được cho ăn tùy thích theo chế độ ăn có hàm lượng béo cao (HFD; 57 kcal% chất béo, #HFD32 của hãng CLEA, Japan). Ở 6 tuần tuổi, các chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm (15 chuột một nhóm). Trong khi một trong số các nhóm không được điều trị theo cách bất kỳ, thì 2 nhóm còn lại được điều trị qua đường miệng hằng ngày bằng chất dẫn hoặc hợp chất thử nghiệm trong 4 tuần. Sau quá trình điều trị 4 tuần, tất cả các chuột bị giết không đau bằng các gây mê, và gan được lấy ra và cố định để nghiên cứu mô học trong dung dịch Bouin (H. Denk, "Fixierung histologischer Präparate" [Fixing of Histological Preparations], in: P. Böck (ed.): "Romeis Mikroskopische Technik" [Romei's Microscopy Techniques], Urban & Schwarzenberg, Munich-Vienna-Baltimore 1989, 17th edition, page 97, ISBN 3-541-11227-1). Sau đó, các mẫu gan được nhúng trong parafin và các lát cắt parafin dày 5 μ m được tạo ra. Các lát cắt mô học của từng gan được nhuộm a) bằng haematoxylin-eosin (HC) để xác định điểm hoạt động của NAFLD (NAS), và b) bằng đồ Picro-Sirius (Waldeck, Germany) để xác định bệnh xơ gan. Điểm hoạt động của NAFLD được xác định trên các lát cắt nhuộm haematoxylin-eosin dựa trên các tiêu chuẩn do D.E khuyến nghị. Kleiner et al., Hepatology 41 (2005), 1313-1321 (Bảng 1). Để định lượng mô học các vùng xơ hóa, 5 ảnh kỹ thuật số (DFC280; Leica, Germany) được chụp đối với mỗi lát cắt với độ phóng đại kính hiển vi 200 lần và tỷ lệ phần trăm xơ hóa được xác định bằng cách sử dụng phần mềm ImageJ Software (National Institute of Health, USA).

Mô hình chuột db/db *in vivo*

Sử dụng 30 chuột nhất db/db đực 8 tuần tuổi. Mô hình này được chấp nhận rộng rãi đối với bệnh béo phì, kháng insulin và tiểu đường typ 2 (Aileen JF King; The use of animal models in diabetes research; British Journal of Pharmacology 166 (2012), 877–894). Trong quá trình thử nghiệm, các chuột được cho ăn chế độ ăn tiêu chuẩn (RM1(E) 801492, SDS) và uống nước từ vòi tùy thích. Các chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm (10 chuột mỗi nhóm) và điều trị qua đường miệng bằng hợp chất thử nghiệm trong 6 tuần. Trong quá trình thử nghiệm, máu được thu nhận từ các chuột ở các thời điểm khác nhau (trước khi bắt đầu điều trị, 3 tuần sau khi bắt đầu điều trị và 2 ngày trước khi kết thúc điều trị) để xác định các thông số về độ nhạy insulin (ví dụ, HbA1c, hàm lượng glucoza, hàm lượng insulin). Ngoài ra, thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (oral glucose tolerance test -OGTT) dưới dạng thông số để xác định độ nhạy

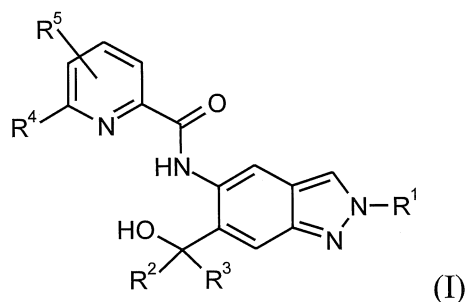
insulin được tiến hành trước khi điều trị 1 ngày và sau khi kết thúc điều trị 2 ngày. Ngoài ra, chỉ số HOMA-IR (mức insulin khi đói (mU/l) * mức glucoza khi đói (mmol/l) / 22,5) được tính toán.

Mô hình ghép khác loài liên quan đến u lympho tế bào B *in vivo*

Hoạt tính chống khối u của các hợp chất có công thức chung (I) theo sáng chế được nghiên cứu trong các mô hình ghép khác loài ở chuột. Nhằm mục đích này, các chuột nhất C.B-17 SCID cái được cấy ghép dưới da bằng các dòng tế bào u lympho tế bào B người, ví dụ, TMD-8. Khi kích cỡ trung bình khối u đạt 20-30 mm², bắt đầu điều trị đơn trị qua đường miệng bằng hợp chất theo sáng chế hoặc bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế kết hợp với liệu pháp chuẩn, từng chất được sử dụng qua đường miệng. Tuy nhiên, các chuột được chia ngẫu nhiên trước đó. Việc điều trị kết thúc ngay khi nhóm đối chứng không được điều trị có khối u lớn. Kích cỡ khối u và thể trọng được xác định ba lần một tuần. Mức giảm thể trọng là số đo độc tính liên quan đến điều trị (> 10% = tới hạn, dừng điều trị đến khi phục hồi, > 20% = độc, kết thúc). Diện tích khối u được phát hiện bằng thước kẹp điện tử [chiều dài (mm) x chiều rộng (mm)]. Cuối thử nghiệm, trọng lượng khối u cũng được xác định. Hiệu quả chống khối u là tỷ lệ giữa trọng lượng khối u của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng (T/C) [trọng lượng khối u của nhóm điều trị vào ngày x/trọng lượng khối u của nhóm đối chứng vào ngày x] hoặc tỷ lệ giữa diện tích khối u của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng [diện tích khối u của nhóm điều trị vào ngày x/diện tích khối u của nhóm đối chứng vào ngày x]. Hợp chất có T/C lớn hơn 0,5 được coi là có hoạt tính (hữu hiệu). Tiến hành phân tích thống kê bằng cách sử dụng phương pháp ANOVA một nhân tố và bằng cách so sánh với nhóm đối chứng bằng phương pháp phân tích so sánh từng cặp (kiểm định Dunnett).

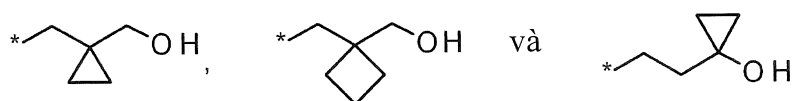
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức chung (I)



trong đó:

R^1 là C_1 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen, hydroxyl, C_3 - C_6 -xycloalkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần bằng halogen, hoặc nhóm R^6 , R^7SO_2 , R^7SO hoặc R^8O , hoặc nhóm được chọn từ:



trong đó * là vị trí gắn kết của nhóm với phần còn lại của phân tử;

R^2 và R^3 luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc C_1 - C_6 -alkyl;

R^4 là halogen, xyano, C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần, giống nhau hoặc khác nhau hoặc C_3 - C_6 -xycloalkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần, giống nhau hoặc khác nhau, và các phần tử thế được chọn từ nhóm gồm halogen và hydroxyl;

R^5 là hydro, halogen hoặc C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần bằng halogen;

R^6 là dị vòng no một vòng không được thế hoặc được thế một hoặc hai lần bằng metyl, có 4 đến 6 nguyên tử trong vòng, mà chứa nguyên tử khác loại hoặc nhóm khác loại từ nhóm gồm O, S, SO và SO_2 ;

R^7 là C_1 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen, hydroxyl hoặc C_3 - C_6 -xycloalkyl;

hoặc R^7 là C_3 - C_6 -xycloalkyl;

R^8 là C_1 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của chúng.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 là C_1 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_6 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng flo, hydroxyl hoặc nhóm R^6 , R^7SO_2 , R^7SO hoặc R^8O ;

R^2 và R^3 luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc C_1 - C_3 -alkyl;

R^4 là halogen, xyano hoặc C_1 - C_3 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_3 -alkyl không được thế hoặc được thế một hoặc nhiều lần giống hoặc khác nhau bằng halogen hoặc hydroxyl;

R^5 là hydro, flo, clo hoặc C_1 - C_3 -alkyl;

R^6 là oxetanyl hoặc tetrahydrofuranyl;

R^7 là C_1 - C_4 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_4 -alkyl không được thế hoặc được thế một lần bằng hydroxyl hoặc bằng xyclopropyl hoặc được thế bằng ba nguyên tử flo;

R^8 là nhóm C_1 - C_4 -alkyl không được thế hoặc nhóm C_1 - C_4 -alkyl được thế ba lần bằng flo.

3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó R^4 là diflometyl, triflometyl hoặc metyl.

4. Hợp chất theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó R^5 là hydro hoặc flo.

5. Hợp chất theo điểm 1, 2, 3 hoặc 4, trong đó R^2 và R^3 đều là hydro hoặc metyl.

6. Hợp chất theo điểm 2, trong đó:

R^1 là C_2 - C_6 -alkyl, trong đó nhóm C_2 - C_6 -alkyl không được thế, hoặc nhóm C_2 - C_6 -alkyl được thế một, hai hoặc ba lần bằng flo hoặc nhóm C_2 - C_6 -alkyl được thế một lần bằng hydroxyl, R^6 , R^7SO_2 , hoặc R^8O , hoặc R^1 là nhóm C_1 - C_3 -alkyl được thế oxetanyl;

R^2 và R^3 luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc metyl;

R^4 là nhóm C_1 - C_3 -alkyl không được thế hoặc được thế một lần hoặc nhiều lần bằng halogen hoặc nhóm C_1 - C_3 -alkyl được thế bằng một nhóm hydroxyl hoặc nhóm C_1 - C_3 -alkyl được thế bằng một nhóm hydroxyl và ba nguyên tử flo;

R^5 là hydro, flo hoặc C_1 - C_3 -alkyl;

R^7 là C_1 - C_3 -alkyl;

R^8 là C_1 - C_4 -alkyl, trong đó nhóm C_1 - C_4 -alkyl không được thế hoặc được thế một, hai hoặc ba lần bằng flo.

7. Hợp chất theo điểm 6, trong đó:

R^1 là nhóm C_2 - C_5 -alkyl được thế bằng hydroxyl hoặc C_1 - C_3 -alkoxy hoặc triflometoxy hoặc 2,2,2-trifloetoxyl hoặc triflometyl hoặc

là nhóm C_2 - C_4 -alkyl được thế metyl- SO_2 hoặc

là nhóm C_1 - C_2 -alkyl được thế oxetan-3-yl;

R^2 và R^3 luôn được xác định giống nhau và đều là hydro hoặc metyl;

R^4 là metyl, etyl, triflo- C_1 - C_3 -alkyl, diflo- C_1 - C_3 -alkyl, hydroxymetyl, 1-hydroxyetyl, 2-hydroxypropan-2-yl và 2,2,2-triflo-1-hydroxyetyl;

R^5 là hydro, flo hoặc metyl.

8. Hợp chất theo điểm 7, trong đó:

R^1 là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-metoxypopyl, 3-hydroxypopyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-

2,2-dimetylpropyl, 3-triflometoxypropyl, 2-metoxetyl, 2-hydroxyetyl, 2-(metylsulphonyl)etyl hoặc 3-(metylsulphonyl)propyl;

R^2 và R^3 đều là methyl hoặc hydro;

R⁴ là diflometyl, triflometyl hoặc metyl;

R^5 là hydro hoặc flo.

9. Hợp chất theo điểm 8, trong đó:

R¹ là 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(metylsulphonyl)etyl;

R^2 và R^3 đều là metyl;

R^4 là diflometyl hoặc triflometyl;

R⁵ là hydro.

10. Hợp chất theo điểm 8, trong đó:

R¹ là 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-hydroxybutyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(metylsulphonyl)etyl;

R^2 và R^3 đều là methyl;

R⁴ là metyl;

$\mathbf{R}^5$ là flo, trong đó $\mathbf{R}^5$ ở vị trí ortho so với $\mathbf{R}^4$.

11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó hợp chất này được chọn từ:

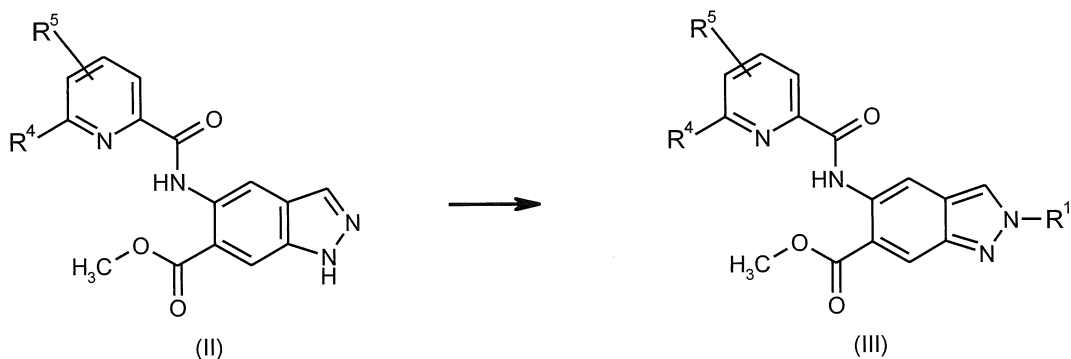
- 1) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(2-metoxyetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 2) N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(2-metoxyetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit

- 3) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(3-metoxypromyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 4) N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(3-metoxypromyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 5) N-[2-(2-Hydroxyetyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 6) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypromyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 7) N-[2-(2-Hydroxyetyl)-6-(hydroxymetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 8) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(oxetan-3-ylmetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 9) N-[6-(Hydroxymetyl)-2-(oxetan-3-ylmetyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 10) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(metylsulphonyl)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 11) N-[2-(3-Hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 12) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[2-(metylsulphonyl)etyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 13) 6-(Diflometyl)-N-[2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit
- 14) 6-(Diflometyl)-N-{6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-[2-(metylsulphonyl)etyl]-2H-indazol-5-yl}pyridin-2-carboxamit
- 15) 6-(Diflometyl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(3-hydroxypromyl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit
- 16) N-[6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-5-yl]-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 17) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(triflometoxy)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit
- 18) N-{6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-[3-(2,2,2-trifloetoxy)propyl]-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit

- 19) 5-flo-N-[2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-metylpyridin-2-carboxamit
- 20) N-[2-(3-Hydroxy-3-metylbutyl)-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl]-6-metylpyridin-2-carboxamit
- 21) 6-(2-Hydroxypropan-2-yl)-N-[6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-(4,4,4-triflobutyl)-2H-indazol-5-yl]pyridin-2-carboxamit; và
- 22) N-{2-[2-(1-Hydroxyxyclopropyl)etyl]-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H-indazol-5-yl}-6-(triflometyl)pyridin-2-carboxamit.

12. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 kết hợp với tá dược trợ, không độc, được dụng.

13. Quy trình điều chế hợp chất có công thức chung (III) từ hợp chất có công thức chung (II):



trong đó

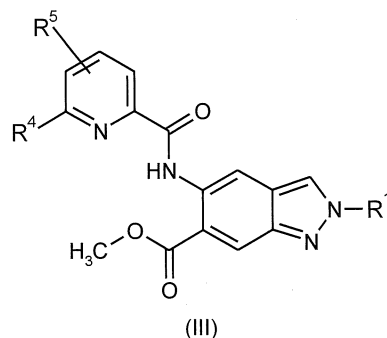
R^1 là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-metoxypopyl, 3-hydroxypopyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-triflometoxypopyl, 2-metoxyetyl, 2-hydroxyetyl, 2-(metylsulphonyl)etyl hoặc 3-(metylsulphonyl)propyl;

R^4 là diflometyl, triflometyl hoặc metyl;

R^5 là hydro hoặc flo;

bằng phản ứng của hợp chất (II) với các alkyl halogenua được thể thích hợp hoặc các alkyl 4-metylbenzensulphonat với sự có mặt của kali cacbonat.

14. Hợp chất có công thức chung (III)



trong đó

R¹ là 4,4,4-triflobutyl, 3-hydroxy-3-metylbutyl, 3-metoxypopyl, 3-hydroxypopyl, 3-hydroxybutyl, 3-hydroxy-2-metylpropyl, 3-hydroxy-2,2-dimetylpropyl, 3-triflometoxypopyl, 2-metoxyetyl, 2-hydroxyetyl, 2-(metylsulphonyl)etyl, 3-(metylsulphonyl)propyl hoặc 2-(1-hydroxyxyclopropyl)etyl;

R⁴ là diflometyl, triflometyl hoặc metyl; và

R⁵ là hydro hoặc flo;

và các chất đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh, muối, solvat hoặc solvat của muối của chúng.

15. Hợp chất có công thức chung (III), trong đó hợp chất này được chọn từ:

metyl 5-{[(5-flo-6-metylpyridin-2-yl)cacbonyl]amino}-2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-2H-indazol-6-carboxylat; và

metyl 2-(3-hydroxy-3-metylbutyl)-5-({[6-(triflometyl)pyridin-2-yl]cacbonyl}amino)-2H-indazol-6-carboxylat.

1/3

Fig. 1

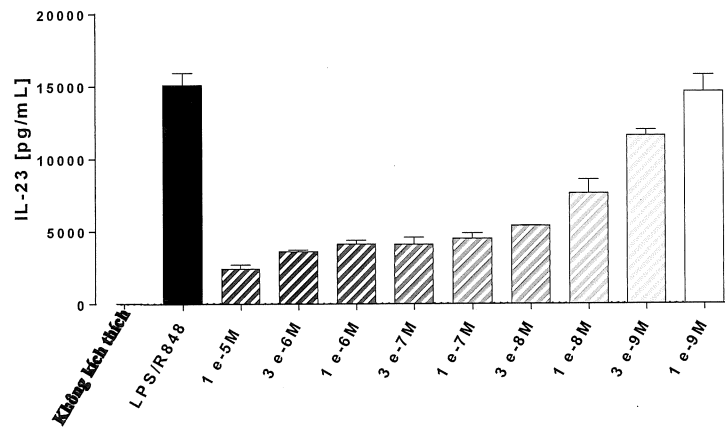
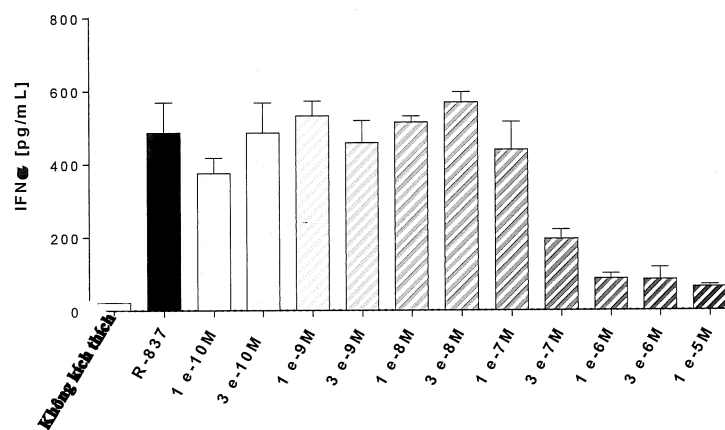


Fig. 2

A



B

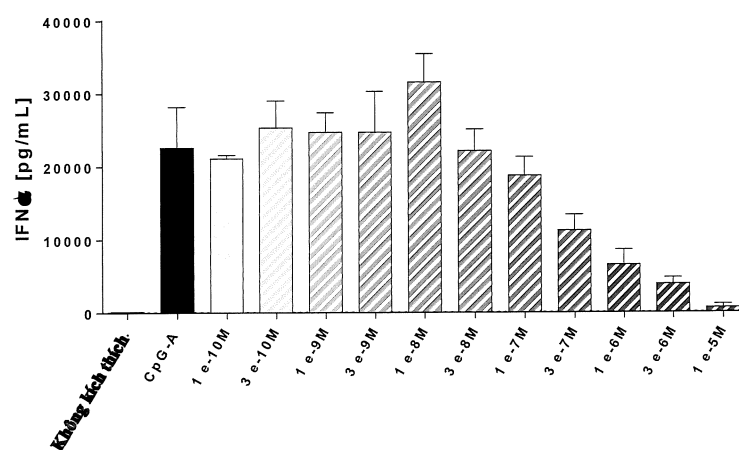


Fig. 3

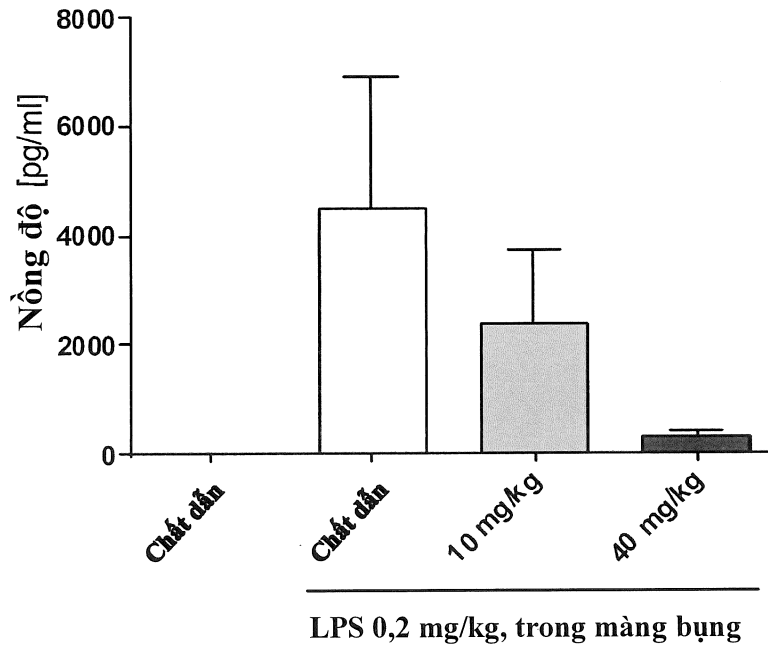


Fig. 4

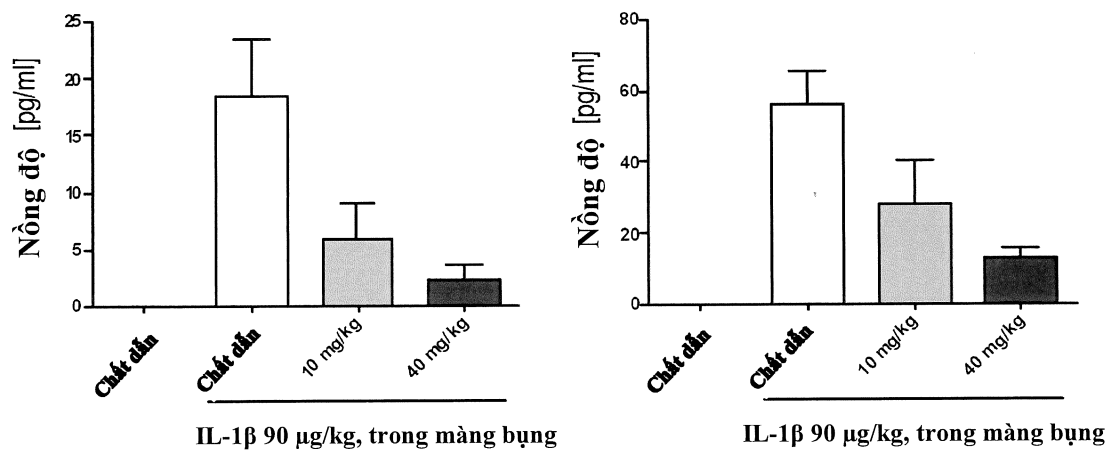


Fig. 5

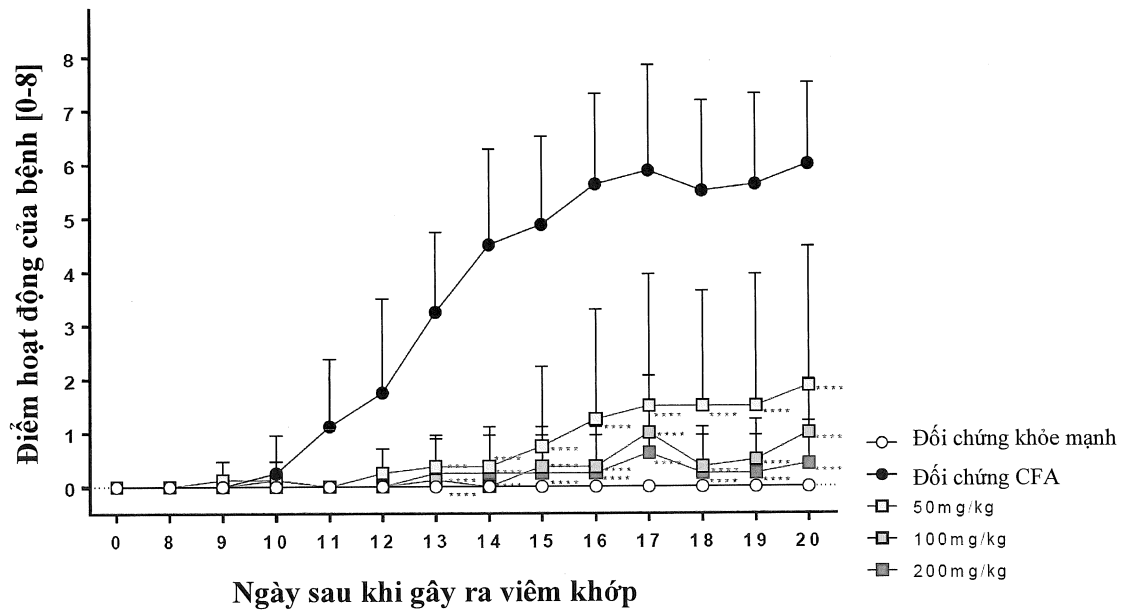


Fig. 6

