



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

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

(11)



1-0041121

(51)<sup>2020.01</sup> C07D 487/04; A61P 37/00; A61K  
31/519; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2020-03127

(22) 28/12/2018

(86) PCT/KR2018/016813 28/12/2018

(87) WO 2019/132561 04/07/2019

(30) 10-2017-0183062 28/12/2017 KR

(45) 25/09/2024 438

(43) 25/09/2020 390

(73) DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (KR)

35-14, Jeyakgongdan 4-gil, Hyangnam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18623,  
Republic of Korea

(72) KIM, In Woo (KR); KIM, Nam Youn (KR); JEONG, Seung Hwan (KR); KIM, Bo-  
Kyoung (KR); LEE, Jun Hee (KR).

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

(54) HỢP CHẤT AMINO-METYLPIPERIDIN LÀM CHẤT ỨC CHẾ KINAZA VÀ  
DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức hóa học 1 sau, hoặc muối dược dụng của  
nó, và hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị các  
bệnh có liên quan đến hoạt tính ức chế kinaza.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất amino-metylpiperidin có hoạt tính ức chế kinaza, quy trình điều chế chúng và ứng dụng của chúng.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Protein kinaza là enzym xúc tác quá trình phosphoryl hóa của các gốc đặc hiệu của các protein khác, và đóng vai trò quan trọng trong con đường truyền tín hiệu mà truyền tín hiệu ngoại bào đến nhân. Ngoài ra, nó liên quan đến các bệnh khác nhau in vivo. Trong quá trình xâm nhập hoặc phát triển bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh hoặc bệnh tăng sinh quá mức, và/hoặc bệnh do hệ miễn dịch, có nhiều bằng chứng cho thấy tế bào T (hoặc tế bào lympho T) và tế bào B (hoặc tế bào lympho B) đóng vai trò quan trọng.

Janus kinaza (sau đây gọi tắt là “JAK”) là kinaza tyrosin protein tế bào chất đóng vai trò then chốt trong việc điều chỉnh chức năng tế bào trong hệ thống chất sinh huyết lympho. Xytokin được biết là đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh chức năng tế bào, viêm và miễn dịch, và JAK hoạt hóa protein STAT (chất biến đổi tín hiệu và chất hoạt hóa của quá trình phiên mã) thông qua phosphoryl hóa tyrosin để cung cấp con đường tạo tín hiệu nhanh đến xytokin. Việc tạo tín hiệu JAK/STAT được biết có liên quan đến dị ứng, bệnh hen, bệnh tự miễn (ví dụ, từ chối cấy ghép, viêm khớp dạng thấp, xơ cứng teo cơ một bên, đa xơ cứng, v.v.), ung thư rắn, ung thư máu (ví dụ, bệnh bạch cầu, u lympho và v.v.).

Họ JAK được phân thành 4 phần: JAK 1, JAK 2, JAK 3, và TYK 2. Các phần của họ JAK bắt cặp với nhau để điều hòa tín hiệu từ nhiều xytokin. Nó bao gồm JAK2 và JAK1 liên quan đến việc tạo tín hiệu yếu tố tăng trưởng chất sinh huyết, và tổ hợp của TYK2 và JAK2 là quan trọng để tạo tín hiệu interferon và góp phần dung nạp vật chủ. JAK2 có thể gây ra thiếu máu, giảm lượng tiểu cầu, giảm bạch cầu, đặc biệt khi có liên quan đến việc tạo tín hiệu yếu tố tăng trưởng chất sinh huyết và gây ra sự ức chế quá mức.

Sự biểu hiện của JAK1, JAK2, và TYK2 được phát hiện là phân bố rộng rãi, trong khi sự biểu hiện của JAK3 bị hạn chế ở các tế bào lympho và có liên quan đến việc tạo tín hiệu cho các chuỗi gama phổ biến, các phần của thụ thể IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 và IL-21, cụ thể là chuỗi gama thông thường của họ IL-2. Ngay khi xytokin được liên kết, thụ thể mang JAK3 liền kề đến gần, điều này gây ra quá trình phosphoryl hóa tự động của đầu tận cùng C chuỗi  $\beta$ . Kết quả là, nó gây ra sự hoạt hóa STAT protein, là bước quan trọng trong việc truyền lại tín hiệu đến hạt nhân. JAK3 kiểm soát con đường tín hiệu của xytokin khác nhau thông qua quy trình này. Điều này tạo ra JAK3 làm đích hút để ức chế miễn dịch.

Tế bào B đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm. Chất điều trị trên cơ sở protein làm giảm tế bào B, ví dụ Rituxan, có hiệu quả trong bệnh viêm gây ra bởi tự kháng thể như viêm khớp dạng thấp. Nhờ đó, chất ức chế protein kinaza đóng vai trò trong hoạt hóa tế bào B là chất điều trị hữu hiệu để điều trị bệnh do tế bào B, ví dụ, sản xuất tự kháng thể.

Truyền tín hiệu qua thụ thể tế bào B (BCR) điều chỉnh các đáp ứng tế bào B khác nhau, bao gồm cả sự tăng sinh và phân biệt thành tế bào tạo

ra kháng thể. BCR là yếu tố điều tiết quan trọng của hoạt tính tế bào B, và sự truyền tín hiệu bất thường có thể gây ra sự tạo thành các tự kháng thể gây bệnh dẫn đến một số lượng lớn bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm và sự tăng sinh của tế bào B không được điều tiết.

Tyrosin kinaza của Bruton (sau đây, gọi tắt là “BTK”) là chất điều tiết quan trọng của việc phát triển, hoạt hóa, tạo tín hiệu và sống sót của tế bào B. BTK có liên quan đến các đường dẫn truyền tín hiệu được bắt đầu bằng cách gắn kết các phối tử ngoại bào khác nhau với thụ thể bề mặt tế bào của chúng. Sau khi thất thụ thể kháng nguyên tế bào B (BCR), hoạt tính của BTK nhờ tác động đồng thời của protein tyrosin kinaza Lyn và Syk là cần thiết để tạo ra sự huy động canxi qua trung gian phospholipaza C- $\gamma$ 2. Do đó, sự ức chế của BTK có thể là phương pháp trị liệu hữu hiệu trong việc phong bế quá trình khởi phát của các bệnh qua trung gian tế bào B.

Như được đề cập ở trên, Janus kinaza và kinaza trên cơ sở TEC đóng vai trò quan trọng trong quá trình hoạt hóa tế bào T và/hoặc tế bào B có liên quan đến đến sự phát triển của bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh hoặc bệnh tăng sinh quá mức, và bệnh qua trung gian miễn dịch. Do vậy, sự phát triển chất mà ức chế hiệu quả các bệnh này có thể hữu ích làm chất điều trị có liên quan. Các ví dụ cụ thể về bệnh có thể được điều trị và ngăn ngừa bao gồm ung thư, từ chối cấy ghép, đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vảy nến, vảy nến, bệnh hen, viêm da dị ứng, viêm da tạng dị ứng, chàm, tiểu đường loại I, biến chứng tiểu đường, viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, rối loạn tuyến giáp do tự miễn, rụng tóc toàn thân, hội chứng Sjogren và bệnh tương tự.

Chất ức chế JAK3 kinaza, tofacitinib (CP-690550) (Pfizer Inc.) hiện

được chấp thuận và bán trên thị trường để điều trị viêm khớp dạng thấp. Ngoài ra, chất ức chế BTK kinaza, ibrutinib (PCI-32765) (Pharmacyclics) trong giai đoạn lâm sàng, nhưng tác dụng phụ nghiêm trọng như phát ban da và tiêu chảy đã được báo cáo trong các trường hợp lâm sàng. Do đó, cần phải phát triển một chất ổn định và hữu hiệu hơn mà ức chế JAK và/hoặc BTK (xem, Nat Rev Rheumatol. 2009 Jun 5(6) 317-24; Expert Opin Investig Drugs. 2014 Aug 23(8) 1067-77; Drug Discov Today 2014 Aug 19(8) 1200-4; WO2002/096909; WO2010-009342).

Do đó, các tác giả sáng chế đã tìm thấy dẫn xuất amino-metylpiperidin mới có hoạt tính ức chế rất tốt làm chất ức chế kinaza, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

#### **Vấn đề kỹ thuật**

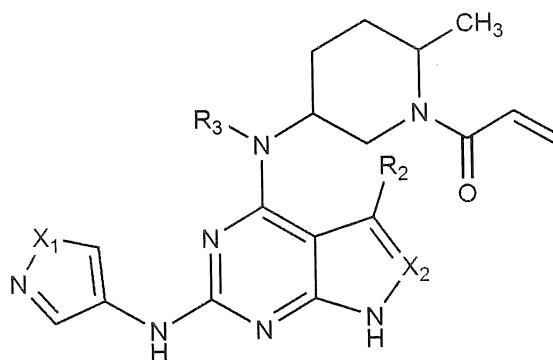
Mục đích của sáng chế là đề xuất amino-metylpiperidin có khả năng ức chế đối với kinaza, cụ thể là tyrosin kinaza, quy trình điều chế chúng và ứng dụng của chúng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa dẫn xuất amino-metylpiperidin làm thành phần hoạt tính.

#### **Giải pháp kỹ thuật**

Để đạt được các mục đích nêu trên, hợp chất có công thức hóa học 1 sau, hoặc muối dược dụng của nó được đề cập ở đây:

Công thức hóa học 1



trong đó, trong công thức hóa học 1,

$X_1$  là N- $R_1$ , O, hoặc S,

$X_2$  là CH, hoặc N,

$R_1$  là  $C_{1-5}$  alkyl,  $C_{3-6}$  xycloalkyl, hoặc  $C_{1-5}$  alkyl được thế bằng (tert-butoxycarbonyl)amino,

$R_2$  là hydro,  $C_{1-5}$  alkyl, hoặc halogen, và

$R_3$  là hydro hoặc  $C_{1-5}$  alkyl.

Tốt hơn là,  $R_1$  là metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, hoặc 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)etyl.

Tốt hơn là,  $R_2$  là hydro, metyl, brom, flo, hoặc clo.

Tốt hơn là,  $R_3$  là hydro, metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, isopentyl, hoặc neopentyl.

Tốt hơn là,  $X_1$  là N- $R_1$  và  $X_2$  là CH.

Các ví dụ đại diện cho hợp chất có công thức hóa học 1 như sau:

- 1) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 2) 1-((2S,5R)-5-((2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-

pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

3) 1-((2S,5R)-5-((2-((1-isobutyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

4) 1-((2S,5R)-5-((2-((1-cyclopentyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

5) tert-butyl 2-(4-((4-((3R,6S)-1-acryloyl-6-methylpiperidin-3-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-2-yl)amino)-1H-pyrazol-1-yl)ethylcarbamate,

6) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-(isothiazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

7) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-(2,2-difluoroethyl)-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

8) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

9) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-cyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

10) 1-((2S,5R)-5-((2-(1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(methylamino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on, và

11) 1-((2S,5R)-5-((3-clo-6-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(methylamino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-

2-en-1-on.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng muối, đặc biệt là muối được dụng. Đối với muối, muối thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, như muối cộng axit được tạo thành bằng axit tự do được dụng có thể được sử dụng không giới hạn. Thuật ngữ “muối được dụng” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ muối cộng hữu cơ hoặc vô cơ bất kỳ của hợp chất có công thức hóa học 1 mà nồng độ của nó có tác dụng hữu hiệu vì nó tương đối không độc hại và vô hại đối với bệnh nhân và có tác dụng phụ không làm suy giảm tác dụng có lợi của hợp chất nêu trên.

Muối được dụng có thể thu được bằng các phương pháp thông thường sử dụng axit vô cơ hoặc axit hữu cơ. Ví dụ, muối được dụng có thể được điều chế bằng cách hòa tan hợp chất có công thức hóa học 1 trong dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước, ví dụ, axeton, metanol, etanol hoặc axetonitril, sau đó bổ sung axit hữu cơ hoặc axit vô cơ, và lọc và làm khô tinh thể được kết tủa. Ngoài ra, nó có thể được điều chế bằng cách đưa dung môi hoặc lượng axit quá mức từ hỗn hợp phản ứng được bổ sung axit vào áp suất bị giảm và sau đó làm khô phần cặn, hoặc bằng cách bổ sung dung môi hữu cơ khác nhau và sau đó lọc muối đã kết tủa. Tại thời điểm này, muối được ưu tiên có thể bao gồm muối có nguồn gốc từ axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit nitric, axit axetic, axit glycolic, axit lactic, axit pyruvic, axit malonic, axit suxinic, axit glutaric, axit fumaric, axit malic, axit mandelic, axit tartaric, axit xitric, axit ascorbic, axit palmitic, axit maleic, axit hydroxymaleic, axit benzoic, axit hydroxybenzoic, axit phenylaxetic, axit xinamic, axit salixylic, axit metansulfonic, axit benzensulfonic hoặc axit toluensulfonic, và axit tương tự.

Muối hoặc solvat được dụng của hợp chất có công thức hóa học 1 có thể được sử dụng làm hợp chất trung gian trong quá trình sản xuất hợp chất có công thức hóa học 1, hoặc solvat hoặc muối được dụng hoặc của nó.

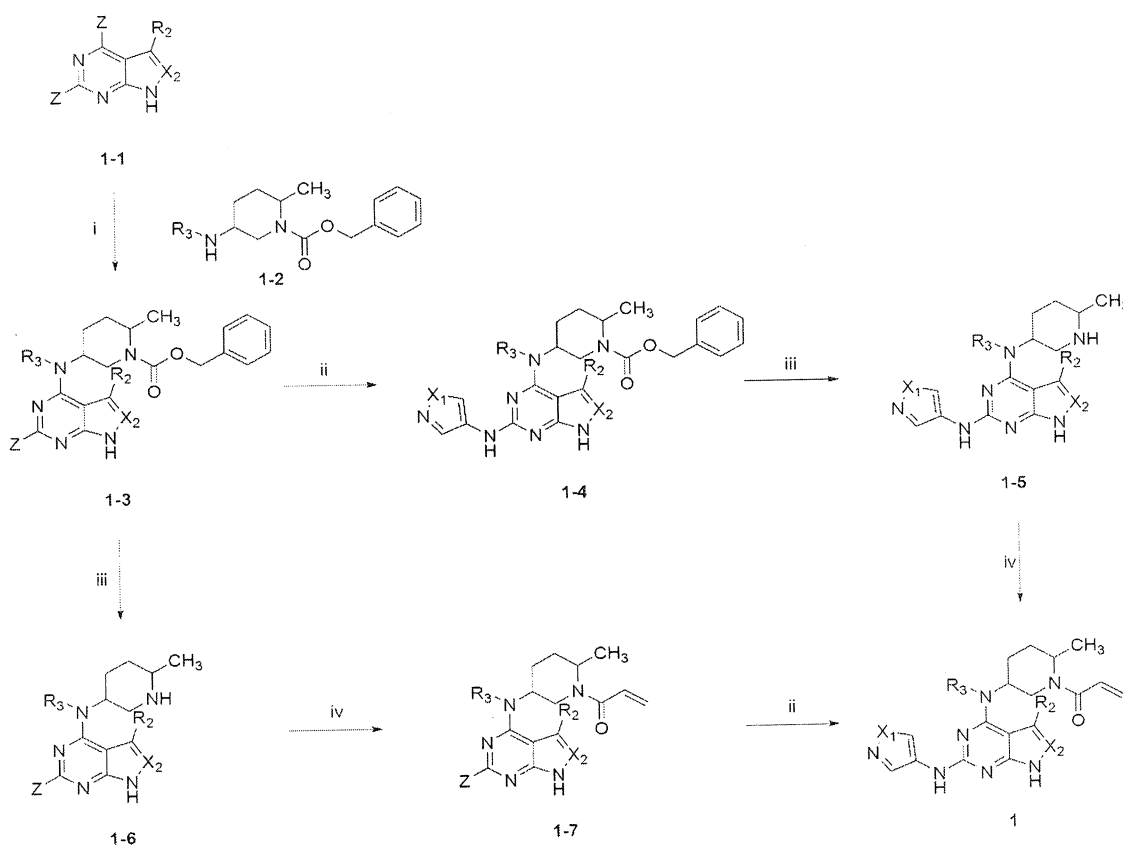


Hợp chất có công thức hóa học 1 theo sáng chế bao gồm không chỉ muối được dụng của nó, mà còn solvat và hydrat có thể được điều chế từ đó, và cũng có thể bao gồm toàn bộ chất đồng phân lập thể. Solvat, hydrat và chất đồng phân lập thể của hợp chất có công thức hóa học 1 có thể được điều chế và sử dụng từ hợp chất có công thức hóa học 1 sử dụng các phương pháp thông thường.

Ngoài ra, hợp chất có công thức hóa học 1 theo sáng chế có thể được điều chế ở dạng tinh thể hoặc ở dạng không phải tinh thể, và khi hợp chất có công thức hóa học 1 được điều chế ở dạng tinh thể, nó có thể được hydrat hóa hoặc solvat hóa tùy ý. Theo sáng chế, hợp chất có công thức hóa học 1 có thể không chỉ bao gồm hydrat hợp thức, mà còn bao gồm hợp chất chứa nhiều lượng nước khác nhau. Solvat của hợp chất có công thức hóa học 1 theo sáng chế bao gồm cả solvat hợp thức và solvat không hợp thức.

Ngoài ra, sáng chế có thể tạo ra hợp chất có công thức hóa học 1 thông qua sơ đồ phản ứng 1 bên dưới làm ví dụ.

#### Sơ đồ phản ứng 1



(trong sơ đồ phản ứng 1,  $X_1$  đến  $X_2$ , và  $R_1$  đến  $R_3$  như được xác định trước đó, Z là halogen, và tốt hơn là Z là clo)

Bước i là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 1-3 bằng cách cho phản ứng hợp chất có công thức hóa học 1-1 với hợp chất có công thức hóa học 1-2. Phản ứng tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ  $0^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn hoặc ở nhiệt độ phòng đến nhiệt độ cao với sự có mặt của natri hydrua hoặc diisopropyletylamin, và dung môi tốt hơn là tetrahydrofuran, etanol, hoặc dimethylformamit.

Bước ii là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 1-4 bằng cách cho phản ứng hợp chất có công thức hóa học 1-3 với amin. Phản ứng tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $100^{\circ}\text{C}$  đến  $120^{\circ}\text{C}$  với sự có mặt của phối tử, chất xúc tác paladi, hoặc bazơ, hoặc thực hiện ở nhiệt độ cao với sự có mặt của axit trifloroaxetic, và dung môi tốt hơn là 1,4-dioxan, tert-butanol hoặc 2-butanol.

Bước iii là phản ứng loại bỏ nhóm bảo vệ của hợp chất có công thức hóa học 1-4, là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 1-5. Phản ứng tốt hơn là được thực hiện bằng paladi với sự có mặt của hydro, hoặc được thực hiện ở nhiệt độ cao trong môi trường axit, tốt hơn là trong môi trường axit clohydric 6N.

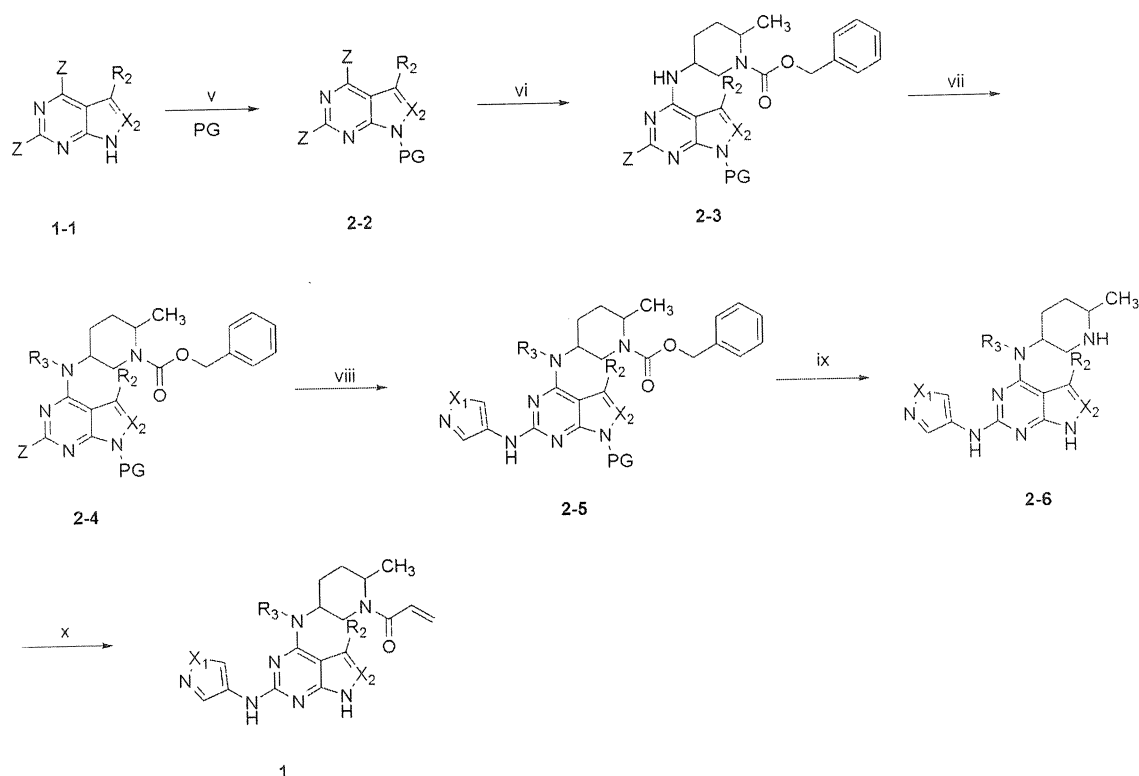
Bước iv là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 1 bằng cách cho phản ứng hợp chất có công thức hóa học 1-5 với axyl clorua. Phản ứng tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $-20^{\circ}\text{C}$  đến  $0^{\circ}\text{C}$  với sự có mặt của trietylamin hoặc natri hydro cacbonat. Ngoài ra, dung môi tốt hơn là hỗn hợp chứa diclorometan hoặc tetrahydrofuran và nước.

Ngoài ra, như được thể hiện trong sơ đồ phản ứng 1, hợp chất có

công thức hóa học 1-3, hợp chất có công thức hóa học 1-6, hợp chất có công thức hóa học 1-7, và hợp chất có công thức hóa học 1 cũng có thể được điều chế theo thứ tự này, và mỗi bước iii, iv, và ii là tương tự như được mô tả bên trên, ngoại trừ các chất phản ứng.

Ngoài ra, sáng chế có thể tạo ra hợp chất có công thức hóa học 1 thông qua sơ đồ phản ứng 2 bên dưới làm ví dụ.

### Sơ đồ phản ứng 2



(trong sơ đồ phản ứng 2, X<sub>1</sub> đến X<sub>2</sub>, và R<sub>1</sub> đến R<sub>3</sub> như được xác định trước đó, PG là hydropyran hoặc 2-(trimetylsilyl)etoxymetyl làm nhóm bảo vệ, và Z là halogen. Tốt hơn là, Z là clo).

Bước v là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 2-2 bằng cách cho phản ứng hợp chất có công thức hóa học 1-1 với nhóm bảo vệ. Phản ứng tốt hơn là được thực hiện với dihydropyran trong môi trường axit, hoặc được thực hiện bằng 2-(trimetylsilyl)etoxymetyl clorua trong môi trường bazơ, và dung môi tốt hơn là diclorometan hoặc

dimetylformamit.

Bước vi là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 2-3 từ hợp chất có công thức hóa học 2-2, và là tương tự bước i của sơ đồ phản ứng 1 ngoại trừ các chất phản ứng.

Bước vii là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 2-4 bằng cách cho phản ứng hợp chất có công thức hóa học 2-3 và  $R_3-I$ . Phản ứng tốt hơn là được thực hiện ở  $0^\circ C$  hoặc thấp hơn, hoặc ở nhiệt độ phòng với sự có mặt của bazơ, tốt hơn là với sự có mặt của natri hydrua, và dung môi tốt hơn là dimetylformamit.

Bước viii là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 2-5 từ hợp chất có công thức hóa học 2-4, và là tương tự bước ii của sơ đồ phản ứng 1 ngoại trừ các chất phản ứng.

Bước ix là bước phản ứng để loại bỏ nhóm bảo vệ của hợp chất có công thức hóa học 2-5, là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 2-6. Phản ứng tốt hơn là được thực hiện ở nhiệt độ cao trong môi trường axit (tốt hơn là, axit trifloroaxetic), hoặc được thực hiện bằng fluorua, tốt hơn là tetrabutylamoni fluorua, trong môi trường bazơ, và dung môi tốt hơn là metanol, tetrahydrofuran, hoặc 1,4-dioxan.

Bước x là bước điều chế hợp chất có công thức hóa học 1 từ hợp chất có công thức hóa học 2-6, và là tương tự bước iv của sơ đồ phản ứng 1 ngoại trừ các chất phản ứng.

Theo phương án khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh có lợi cho hoạt động ức chế kinaza, chứa hợp chất có công thức hóa học 1, hoặc muối dược dụng, hydrat, solvat hoặc chất đồng phân của nó làm thành phần hoạt tính.

Trong trường hợp này, bệnh có liên quan đến hoạt động ức chế kinaza bao gồm bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh hoặc bệnh tăng sinh quá mức, và bệnh do hệ miễn dịch, ung thư, khối u hoặc tương tự.

Thuật ngữ “ngăn ngừa” như được sử dụng ở đây đề cập đến bất kỳ hành động nào nhằm trì hoãn hoặc ức chế sự xuất hiện, lan rộng hoặc tái phát các bệnh được đề cập bên trên bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế, và thuật ngữ “điều trị” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ bất kỳ hành động nào nhằm cải thiện hoặc thay đổi triệu chứng của các bệnh nêu trên tốt hơn bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng để sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài ruột theo quy định thực hành dược tiêu chuẩn. Các dạng bào chế này có thể chứa chất phụ gia như chất mang, chất phụ hoặc chất pha loãng được dùng ngoài thành phần hoạt tính.

Chất mang thích hợp bao gồm, ví dụ, nước muối sinh lý, polyetylen glycol, etanol, dầu thực vật, và isopropyl myristat và tương tự. Chất pha loãng bao gồm, ví dụ, lactose, dextrose, sucrose, manitol, sorbitol, xenluloza và/hoặc glyxin và tương tự, nhưng không giới hạn ở những chất này. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được hòa tan trong dầu, propylen glycol hoặc các dung môi khác thường được sử dụng dung dịch tiêm điều chế. Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế trong thuốc mỡ hoặc kem để sử dụng khu trú.

Dạng liều lượng dược của hợp chất theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng các hợp chất ở dạng muối hoặc solvat dược dụng của nó, và việc sử dụng hợp chất một mình hoặc như tổ hợp và/hoặc hỗn hợp thích hợp cùng với hợp chất có hoạt tính dược.

Hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế thành dung dịch tiêm

bằng cách hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hóa hợp chất trong dung môi hòa tan trong nước như nước muối thường, 5% dextroza hoặc dung môi không chứa nước như axit glyxerit béo tổng hợp, este của axit béo cao hơn hoặc propylen glycol. Các dạng bào chế theo sáng chế có thể bao gồm chất phụ gia thông thường như chất hòa tan, chất đẳng trương, chất tạo huyền phù, chất nhũ hóa, chất làm ổn định và chất bảo quản.

Liều được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế có thể được thay đổi theo tình trạng và cân nặng của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng của bệnh, loại thuốc, và con đường và thời gian sử dụng, nhưng nó có thể được lựa chọn thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để đạt được hiệu quả mong muốn, tuy nhiên, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng hàng ngày với liều nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 100 mg/kg (khối lượng cơ thể), và tốt hơn là 0,001 đến 100 mg/kg (khối lượng cơ thể). Việc sử dụng có thể được thực hiện một lần một ngày hoặc chia liều mỗi ngày qua đường miệng hoặc ngoài ruột. Phụ thuộc vào phương pháp sử dụng, chế phẩm có thể chứa hợp chất theo sáng chế với lượng 0,001 đến 99% khối lượng, tốt hơn là 0,01 đến 60% khối lượng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho động vật có vú như chuột cống, chuột, gia súc, con người, thông qua các con đường khác nhau. Việc sử dụng có thể được thực hiện thông qua toàn bộ phương pháp có thể, ví dụ, tiêm qua đường miệng, trực tràng, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong màng trong tử cung, não tâm thất.

Hiệu quả có lợi

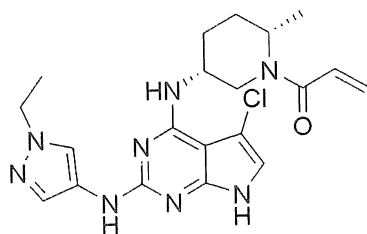
Hợp chất có công thức hóa học 1 theo sáng chế hoặc muối, hydrat, solvat hoặc chất đồng phân dược dụng của nó có thể được sử dụng hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh có liên quan đến hoạt động ức chế

kinaza.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này được cung cấp chỉ với mục đích minh họa, và không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



Bước 1: Điều chế benzyl(2S,5R)-5-((2,5-diclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-carboxylat

Sau khi 2,4,5-triclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin (11,1 g, 50,0 mmol) được hòa tan trong etanol (10,0 mL), N,N-diisopropyletylamin (26,1 mL, 150,0 mmol) và benzyl(2S,5R)-5-amino-2-methylpiperidin-1-carboxylat (14,9 g, 60,0 mmol) được bổ sung vào đó. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 12 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách ra. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 19,9 g (hiệu suất: 91,7%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,40-7,20(m, 5H), 7,03(s, 1H), 5,18-5,06(m, 2H), 4,50-4,30(m, 2H), 4,16-4,04(m, 1H), 2,94-2,85(m, 1H), 1,95-1,77(m, 3H), 1,70-1,60(m, 1H), 1,24-1,20(m, 3H)

Bước 2: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Benzyl(2S,5R)-5-((2,5-diclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (19,9 g, 46,0 mmol) và 1-etyl-1H-pyrazol-4-amin (3,9 g, 35,0 mmol) được hòa tan trong 2-butanol (190,0 mL). Sau khi bổ sung axit trifloroaxetic (3,2 mL, 42,0 mmol), hỗn hợp phản ứng được phản ứng ở nhiệt độ 110°C trong 12 giờ, và sau đó dung môi được cô. Sản phẩm phản ứng được trung hòa bằng cách bổ sung dung dịch amoniac 7N được hòa tan trong metanol, và sau đó phần cần được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 4,7 g (hiệu suất: 26,5%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,90(s, 1H), 7,51(s, 1H), 7,40-7,20(m, 5H), 6,78(s, 1H), 5,18-5,06(m, 2H), 4,54-4,38(m, 2H), 4,27-4,10(m, 1H), 4,10-4,00(m, 2H), 2,94-2,85(m, 1H), 1,99-1,70(m, 4H), 1,43-1,35(m, 3H), 1,28-1,20(m, 3H)

Bước 3: Điều chế 5-clo-N<sup>2</sup>-(1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)-N<sup>4</sup>-((3R,6S)-6-metylpiperidin-3-yl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-2,4-diamin

Dung dịch axit clohydric 6N (47,0 mL, quá mức) được hòa tan trong metanol được bổ sung vào benzyl (2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (4,7 g, 9,5 mmol). Sau khi khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 6 giờ, sản phẩm phản ứng được cô và sau đó phản ứng tiếp theo được thực hiện không cần tách.

Bước 4: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-

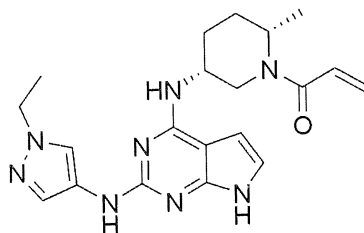


l-on

Sau khi 5-clo-N<sup>2</sup>-(1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)-N<sup>4</sup>-((3R,6S)-6-methylpiperidin-3-yl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-2,4-diamin (3,3 g, 9,0 mmol) và natri bicacbonat (599,8 mg, 6,9 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran / nước cất (15,0 mL/3,0 mL), acryloyl clorua (720,0 uL, 9,0 mmol) được bổ sung vào đó ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 1,4 mg (hiệu suất: 36,8%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,95(s, 1H), 7,50(s, 1H), 6,94-6,55(m, 2H), 6,33-6,06(m, 1H), 5,86-5,53(m, 1H), 4,56-4,14(m, 2H), 4,13-4,00(m, 2H), 3,14-2,67(m, 1H), 2,18-2,12(m, 1H), 2,04-1,98(m, 1H), 1,97-1,76(m, 3H), 1,46-1,38(m, 3H), 1,37-1,17(m, 3H)

Ví dụ 2: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

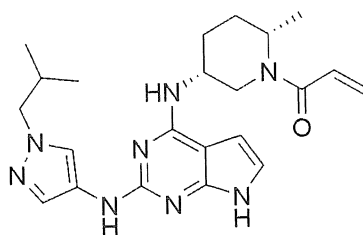


5,4 mg (hiệu suất: 46,1%) hợp chất nêu ở tiêu đề thu được theo cách tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ rằng 2,4-diclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin được sử dụng thay vì 2,4,5-triclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin trong ví dụ 1.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,96-7,91(m, 1H), 7,52-7,47(m,

1H), 6,88-6,57(m, 2H), 6,40-6,38(m, 1H), 6,23-6,13(m, 1H), 5,79-5,56(m, 1H), 4,47-4,07(m, 4H), 3,00-2,70(m, 1H), 2,01-1,81(m, 4H), 1,44-1,41(m, 3H), 1,35-1,34(m, 1H), 1,26-1,22(m, 2H)

Ví dụ 3: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-((1-isobutyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



Bước 1: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((2-clo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Sau khi benzyl (2R,5S)-5-amino-2-metylpiperidin-1-carboxylat (10,0 g, 40,27 mmol) được hòa tan trong etanol (500,0 mL), N,N-diisopropyletylamin (35,1 mL, 201,4 mmol) và 2,4-diclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin (9,1 g, 48,3 mmol) được bổ sung vào đó. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 110°C trong 12 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 14,6 mg (hiệu suất: 90,7%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11,00(s, 1H), 7,48-7,30(m, 5H), 7,03(s, 1H), 6,38(s, 1H), 5,41-4,93(m, 2H), 4,63-4,41(m, 2H), 4,22-4,19(m, 1H), 2,77-2,75(m, 1H), 2,09-2,06(m, 1H), 1,98-1,83(m, 1H), 1,78-1,45(m, 2H), 1,39-1,10(m, 3H)

Bước 2: Điều chế 2-clo-N-((3R,6S)-6-metylpiperidin-3-yl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin

Sau khi benzyl (2S,5R)-5-((2-clo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-carboxylat (14,4 g 36,0 mmol) được hòa tan trong etanol (500,0 mL), paladi/cacbon (1,4 g) được bổ sung vào đó, và lò phản ứng được đóng kín. Không khí bên trong lò phản ứng được loại bỏ sử dụng bơm chân không, và phản ứng hydro hóa qua trung gian paladi được thực hiện thông qua việc thay thế khí hydro. Sau khi phản ứng tiến hành ở nhiệt độ phòng trong khoảng 3 giờ, paladi được loại bỏ qua miếng lọc xelit, và etanol được cô dưới điều kiện áp suất giảm. 6,9 g (hiệu suất: 60,2%) hợp chất nêu ở tiêu đề thu được không cần tinh chế thêm.

Bước 3: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-clo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

Sau khi 2-clo-N-((3R,6S)-6-methylpiperidin-3-yl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (6,8 g, 25,7 mmol) và natri bicacbonat (4,3 g, 51,3 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran/nước cất (300,0 mL/30,0 mL), acryloyl clorua (2,1 mL, 25,7 mol) được bổ sung vào đó ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 3,3 mg (hiệu suất: 40,2%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11,82(s, 1H), 7,08-7,06(m, 1H), 6,95-6,48(m, 1H), 6,45-6,16(m, 2H), 5,74-5,72(m, 1H), 5,50(s, 1H), 5,02(s, 1H), 4,46(s, 1H), 4,11-4,09(m, 1H), 2,88(s, 1H), 2,10-2,08(m, 1H), 1,95-1,61(m, 4H), 1,45-1,03(m, 3H)

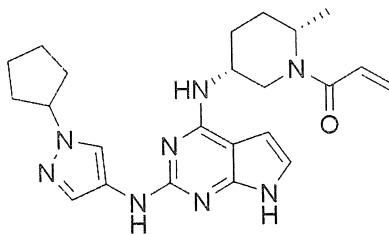
Bước 4: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-((1-isobutyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-

7H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

Tert-butanol (2,0 mL) được bổ sung vào 1-((2S,5R)-5-((2-clo-7H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (100,0 mg, 0,3 mmol) và 1-isobutyl-1H-pyrazol-4-amin (45,3 mg, 0,3 mmol). Tris(dibenzylidinaeton)dipaladi (28,6 mg, 0,03 mmol), 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl (22,4 mg, 0,05 mmol) và kali cacbonat (86,4 mg, 0,6 mmol) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 150°C trong khoảng thời gian từ 2 đến 3 giờ và sau đó được làm mát xuống nhiệt độ phòng. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 15,0 mg (hiệu suất: 11,4%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,43(s, 1H), 7,82(s, 1H), 7,53-7,44(m, 1H), 6,74(s, 1H), 6,65-6,62(m, 1H), 6,40(s, 1H), 6,33-6,30(m, 1H), 6,24(s, 1H), 5,70-5,68(m, 1H), 5,03(s, 1H), 4,72-4,70(m, 1H), 4,34(s, 1H), 4,17-4,06(m, 1H), 3,94-3,73(m, 2H), 2,86(s, 2H), 2,28-2,07(m, 3H), 1,95-1,81(m, 1H), 1,79-1,58(m, 6H), 1,40-1,15(m, 8H), 1,00-0,83(m, 6H)

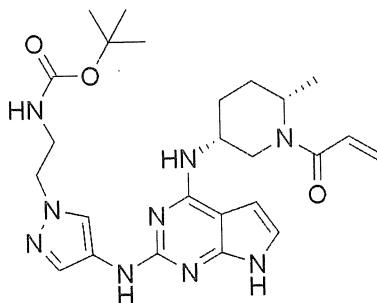
Ví dụ 4: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-((1-cyclopentyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



25,8 mg (hiệu suất: 18,4%) hợp chất nêu ở tiêu đề được thu theo cách tương tự như trong ví dụ 3, ngoại trừ rằng 1-xyclopentyl-1H-pyrazol-4-amin được sử dụng thay vì 1-isobutyl-1H-pyrazol-4-amin trong ví dụ 3.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,09(s, 1H), 7,86(s, 1H), 7,50-7,48(m, 1H), 6,75-6,53 (m, 2H), 6,44(s, 1H), 6,32-6,29(m, 1H), 6,21(s, 1H), 5,67(s, 1H), 4,99(s, 1H), 4,74-4,70(m, 1H), 4,58-4,55(m, 1H), 2,82(s, 1H), 2,45-2,21(m, 1H), 2,12-1,56(m, 6H), 1,32-1,07(m, 4H), 0,92-0,76(m, 3H)

Ví dụ 5: Điều chế tert-butyl 2-(4-((4-((3R,6S)-1-acryloyl-6-methylpiperidin-3-yl)amino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-2-yl)amino)-1H-pyrazol-1-yl)ethylcarbamate

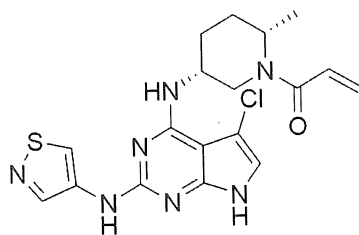


111,5 mg (hiệu suất: 69,7%) hợp chất nêu ở tiêu đề được thu theo cách tương tự như trong ví dụ 3, ngoại trừ rằng tert-butyl(2-(4-amino-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)carbamate được sử dụng thay vì 1-isobutyl-1H-pyrazol-4-amin trong ví dụ 3.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,00(s, 1H), 7,82-7,79(m, 1H), 7,50(s, 1H), 6,71(s, 1H), 6,65-6,59(m, 1H), 6,33-6,29(m, 1H), 6,23(s, 1H), 5,72-5,69(m, 1H), 4,14-4,10(m, 4H), 3,52-3,48(m, 2H), 2,04-2,02(m, 2H), 1,95-1,60(m, 4H), 1,50-1,47(m, 9H), 1,22-1,19(m, 3H)

Ví dụ 6: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-(isothiazol-4-yl)amino)-7H-

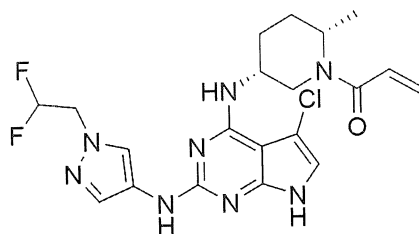
pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



5,9 mg (hiệu suất: 25,6%) hợp chất nêu ở tiêu đề được thu theo cách tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ rằng isothiazol-4-amin được sử dụng thay vì 1-ethyl-1H-pyrazol-4-amin trong ví dụ 1.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,95-8,80(m, 1H), 8,62-8,50(m, 1H), 6,90-6,60(m, 2H), 6,33-6,10(m, 1H), 5,80-5,60(m, 1H), 4,65-4,08(m, 2H), 3,18-2,70(m, 1H), 2,10-1,75(m, 5H), 1,30-1,20(m, 3H)

Ví dụ 7: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((5-chloro-2-((1-(2,2-difluoroethyl)-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

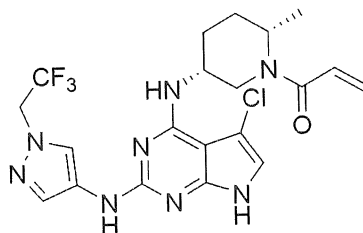


9,9 mg (hiệu suất: 39,3%) hợp chất nêu ở tiêu đề được thu theo cách tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ rằng 1-(2,2-difluoroethyl)-1H-pyrazol-4-amin được sử dụng thay vì 1-ethyl-1H-pyrazol-4-amin trong ví dụ 1.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,15-7,95(m, 1H), 7,70-7,50 (m, 1H), 6,90-6,55(m, 2H), 6,30-5,95(m, 2H), 5,80-5,55(m, 1H), 4,60-4,38(m, 3H), 4,30-4,10(m, 1H), 3,18-2,65(m, 1H), 2,05-1,65(m, 5H), 1,40-1,20(m, 3H)

Ví dụ 8: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((5-chloro-2-((1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-

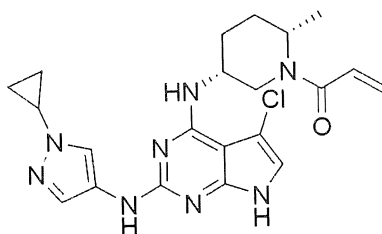
pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



9,2 mg (hiệu suất: 35,3%) hợp chất nêu ở tiêu đề được thu theo cách tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ rằng 1-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-pyrazol-4-amin được sử dụng thay vì 1-ethyl-1H-pyrazol-4-amin trong ví dụ 1.

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,17-8,12(m, 1H), 7,58-7,55(m, 1H), 6,86-6,72(m, 2H), 6,28-6,18(m, 1H), 5,79-5,66(m, 1H), 4,82-4,81(m, 2H), 4,50-4,48(m, 1H), 4,26-4,15(m, 1H), 3,05-2,77(m, 1H), 2,01-1,83(m, 4H), 1,35-1,23(m, 4H)

Ví dụ 9: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

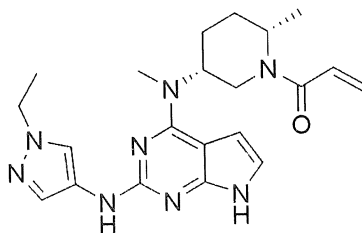


5,0 mg (hiệu suất: 21,0%) hợp chất nêu ở tiêu đề được thu theo cách tương tự như trong ví dụ 1, ngoại trừ rằng 1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-amin được sử dụng thay vì 1-ethyl-1H-pyrazol-4-amin trong ví dụ 1.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,98(s, 1H), 7,48(s, 1H), 6,82-6,64(m, 2H), 6,21-6,18(m, 1H), 5,75-5,61(m, 1H), 4,58-4,56(m, 1H),

4,26-4,19(m, 1H), 3,52-3,50(m, 1H), 3,05-2,77(m, 1H), 2,05-1,82(m, 4H), 1,36-1,31(m, 4H), 1,03-0,98(m, 4H)

Ví dụ 10: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-(1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



Bước 1: Điều chế 2,4-diclo-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin

2,4-diclo-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin (400,0 mg, 2,1 mmol) và natri hydrua (93,6 mg, 2,3 mmol) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (4,0 mL), và sau đó hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút. 2-(Trimetylsilyl)etoxymetyl clorua (415,0 uL, 2,3 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, sau đó khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 30 phút. Sau khi bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 585,0 mg (hiệu suất: 80,4%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,66-7,65(m, 1H), 6,72-6,71(m, 1H), 5,63(s, 2H), 3,59-3,56(m, 2H), 0,91-0,88(m, 2H), 0,07(s, 9H)

Bước 2: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((2-clo-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Sau khi benzyl (2S,5R)-5-amino-2-metylpiperidin-1-carboxylat



(390,1 mg, 1,6 mmol), 2,4-diclo-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin (500,0 mg, 1,6 mmol) và N, N-diisopropyl (821,0 uL, 4,7 mmol) được hòa tan trong etanol (3,0 mL), nhiệt độ được tăng lên 150°C và hỗn hợp được khuấy trong 12 giờ. Dung dịch được cô dưới điều kiện áp suất giảm, và phần cặn thu được được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 717,8 mg (hiệu suất: 86,2%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,40-7,29(m, 5H), 7,13-7,12(m, 1H), 6,61-6,60(m, 1H), 5,48(s, 2H), 5,18-5,12(m, 2H), 4,49-4,47(m, 1H), 4,36-4,34(m, 1H), 4,12-4,10(m, 1H), 3,54-3,53(m, 2H), 2,85-2,80(m, 1H), 1,93-1,70(m, 3H), 1,25-1,22(m, 4H), 0,88-0,85(m, 2H), 0,07(s, 9H)

Bước 3: Điều chế benzyl(2S,5R)-5-((6-clo-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-carboxylat

Sau khi benzyl (2S,5R)-5-((2-clo-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-carboxylat (170,0 mg, 0,3 mmol) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (2,0 mL), natri hydrua (25,7 mg, 0,6 mmol) được bổ sung vào đó và sau đó khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút. Sau đó, metyl iodua (30,0 uL, 0,5 mmol) được bổ sung và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 2 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat vào hỗn hợp, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 165,2 mg (hiệu suất: 94,7%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,35-7,23(m, 5H), 7,13-7,07(m, 1H), 6,61-6,58(m, 1H), 5,47(s, 2H), 5,17-5,06 (m, 2H), 4,61-4,60(m, 1H), 4,46-4,44(m, 1H), 3,54-3,50(m, 2H), 3,25(s, 3H), 3,17-3,14(m, 1H), 2,15-2,12(m, 1H), 1,87-1,65(m, 3H), 1,24-1,21(m, 4H), 0,88-0,84(m, 2H),

0,07(s, 9H)

Bước 4: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Tert-butanol (4,0 mL) được bổ sung vào benzyl(2S,5R)-5-((6-clo-1-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (165,2 mg, 0,3 mol) và 1-etyl-1H-pyrazol-4-amin (30,4 mg, 0,3 mmol). Tris(dibenzylidinaxeton)dipaladi (13,9 mg, 0,02 mmol), 2-dixyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl (14,5 mg, 0,03 mmol) và kali cacbonat (92,3 mg, 0,7 mmol) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 150°C trong 12 giờ và sau đó được làm mát xuống nhiệt độ phòng. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 149,4 mg (hiệu suất: 79,5%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,93(s, 1H), 7,54-7,21(m, 6H), 6,87-6,83(m, 1H), 6,53-6,51(m, 1H), 5,49(s, 2H), 5,19-5,05 (m, 2H), 4,49-4,48(m, 1H), 4,13-4,07(m, 3H), 3,25(s, 3H), 3,15-3,10(m, 1H), 2,15-2,11(m, 1H), 1,93-1,75(m, 4H), 1,43-1,40(m, 3H), 1,28-1,24(m, 3H), 0,90-0,87(m, 2H), 0,01(s, 9H)

Bước 5: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Benzyl (2S,5R)-5-((2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin-4-

yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (133,5 mg, 0,2 mmol), etylendiamin (43,7 uL, 0,6 mmol), và tetrabutylamoni fluorua 1,0M (647,1 uL, 0,6 mmol) được hòa tan trong dung dịch tetrahydrofuran được hòa tan trong tetrahydrofuran (2,0 mL), và sau đó hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 160°C trong 12 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 72,3 mg (hiệu suất: 68,6%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,82(s, 1H), 7,47(s, 1H), 7,35-7,19(m, 5H), 6,74-6,71(m, 1H), 6,40-6,38(m, 1H), 5,15-5,01(m, 2H), 4,83-4,80(m, 1H), 4,43-4,41(m, 1H), 4,03-4,00(m, 3H), 3,22(s, 3H), 3,09-3,06(m, 1H), 1,82-1,65(m, 3H), 1,36-1,34(m, 3H), 1,25-1,21(m, 4H)

Bước 6: Điều chế N<sup>2</sup>-(1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)-N<sup>4</sup>-metyl-N<sup>4</sup>-((3R,6S)-6-metylpiperidin-3-yl)-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-2,4-diamin

Sau khi bổ sung metanol vào benzyl (2S,5R)-5-((2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (72,3 mg, 0,1 mmol) và paladi/cacbon (7,0 mg), không khí được thay thế bằng hydro và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Sau khi lọc dưới điều kiện áp suất giảm qua xelit, phần cặn được cô dưới điều kiện áp suất giảm để thu được 53,0 mg (hiệu suất: 100,0%) hợp chất nêu ở tiêu đề, và phản ứng tiếp theo được thực hiện không cần tách tiếp.

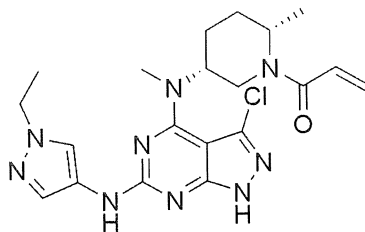
Bước 7: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((2-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

Sau khi N<sup>2</sup>-(1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)-N<sup>4</sup>-metyl-N<sup>4</sup>-((3R,6S)-6-

methylpiperidin-3-yl)-7H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2,4-diamin (53,0 mg, 0,1 mmol) và natri bicarbonat (37,3 mg, 0,4 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran/nước cất (0,75 mL/0,25 mL), acryloyl clorua (12,0 uL, 0,1 mmol) được bổ sung vào đó ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi bổ sung ethyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 29,0 mg (hiệu suất: 48,0%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,90(s, 1H), 7,55(s, 1H), 6,84-6,61(m, 1H), 6,26-6,19(m, 1H), 5,75-5,68(m, 1H), 4,63-4,61(m, 1H), 4,51-4,42(m, 1H), 4,13-4,01(m, 3H), 3,41-3,06(m, 4H), 2,21-2,18(m, 1H), 1,88-1,81(m, 3H), 1,44-1,41(m, 3H), 1,35-1,30(m, 3H)

Ví dụ 11: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((3-clo-6-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(methyl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on



Bước 1: Điều chế 3,4,6-triclo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin

3,4,6-triclo-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (600,0 mg, 2,7 mmol), dihydropyran (735,0 uL, 8,1 mmol) và axit p-toluensulfonic (51,1 mg, 0,3 mmol) được hòa tan trong diclorometan (10,0 mL), và sau đó khuấy ở nhiệt độ 120°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được cô dưới điều kiện áp

suất giảm, và sau đó phần cặn thu được được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 715,9 mg (hiệu suất: 86,7%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5,98-5,95(m, 1H), 4,05-4,02(m, 1H), 3,81-3,76(m, 1H), 2,46-2,43(m, 1H), 2,14-2,10(m, 1H), 1,98-1,95(m, 1H), 1,82-1,62(m, 3H)

Bước 2: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((3,6-diclo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Benzyl (2S,5R)-5-amino-2-metylpiperidin-1-carboxylat (242,2 mg, 1,0 mmol), 3,4,6-triclo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (300,0 mg, 1,0 mmol) và N,N-diisopropyl (203,9 uL, 1,2 mmol) được hòa tan trong etanol (2,0 mL) và sau đó khuấy ở nhiệt độ 190°C trong 5 giờ. Sản phẩm phản ứng được cô dưới điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn thu được được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 446,3 mg (hiệu suất: 92,0%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,39-7,29(m, 5H), 5,80-5,78(m, 1H), 5,18-5,10(m, 2H), 4,48-4,46(m, 1H), 4,29-4,22(m, 2H), 4,04-4,02(m, 1H), 3,78-3,75(m, 1H), 3,02-3,00(m, 1H), 2,41-2,33(m, 1H), 2,08-1,61(m, 9H), 1,25-1,22(m, 3H)

Bước 3: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((3,6-diclo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Sau khi benzyl (2S,5R)-5-((3,6-diclo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (200,0 mg, 0,4 mmol) được hòa tan trong N,N-dimetylformamit (2,0 mL),

natri hydrua (30,8 mg, 0,8 mmol) được bổ sung vào đó và sau đó khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 5 phút. Metyl iodua (40,0 uL, 0,6 mmol) được bổ sung và được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 6 giờ. Sau khi bổ sung nước cất, hỗn hợp được lọc dưới điều kiện áp suất giảm để thu được 205,4 mg (hiệu suất: 100,0%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,36-7,31(m, 5H), 5,87-5,85(m, 1H), 5,14-5,09(m, 2H), 4,47-4,45(m, 2H), 4,18-4,13(m, 1H), 4,03-4,01(m, 1H), 3,79-3,77(m, 1H), 3,32(s, 3H), 3,18-3,16(m, 1H), 2,39-1,59(m, 10H), 1,28-1,26(m, 3H)

Bước 4: Điều chế benzyl (2S,5R)-5-((3-clo-6-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(metyl) amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat

Sau khi benzyl (2S,5R)-5-((3,6-diclo-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-metylpiperidin-1-carboxylat (200,0 mg, 0,4 mmol) và 1-etyl-1H-pyrazol-4-amin (32,0 mg, 0,3 mmol) được hòa tan trong 2-butanol (3,0 mL), axit trifloroaxetic (26,5 uL, 0,3 mmol) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp được phản ứng 200°C trong 6 giờ. Sản phẩm phản ứng được cô và sau đó được trung hòa bằng cách bổ sung dung dịch amoniac / metanol 7N, và phân căn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 92,3 mg (hiệu suất: 61,1%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,92-7,89(m, 1H), 7,56-7,53(m, 1H), 7,37-7,24(m, 5H), 5,18-5,04(m, 2H), 4,59-4,45(m, 2H), 4,17-4,07(m, 3H), 3,29(s, 3H), 3,18-3,16(m, 1H), 2,17-2,13(m, 1H), 1,88-1,76(m, 3H), 1,45-1,42(m, 3H), 1,28-1,25(m, 3H)

Bước 5: Điều chế 3-clo-N<sup>6</sup>-(1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)-N<sup>4</sup>-metyl-N4-

((3R,6S)-6-methylpiperidin-3-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin

Benzyl (2S,5R)-5-((3-clo-6-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl) amino)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-methylpiperidin-1-carboxylat (39,0 mg, 0,1 mmol) và axit trifloroaxetic (3,0 mL) được hòa tan trong 2-butanol (1,0 mL), và sau đó khuấy ở nhiệt độ 190°C trong 18 giờ. Sản phẩm phản ứng được cô và sau đó được trung hòa bằng cách bổ sung dung dịch amoniac / metanol 7N, và được cô dưới điều kiện áp suất giảm để thu được 29,0 mg (hiệu suất: 100,0%) hợp chất nêu ở tiêu đề, và phản ứng tiếp theo được thực hiện không cần tách tiếp.

Bước 6: Điều chế 1-((2S,5R)-5-((3-clo-6-((1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(metyl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on

Sau khi 3-clo-N<sup>6</sup>-(1-etyl-1H-pyrazol-4-yl)-N<sup>4</sup>-metyl-N4-((3R,6S)-6-methylpiperidin-3-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4,6-diamin (29,0 mg, 0,1 mmol) và natri bicacbonat (38,8 mg, 0,2 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran / nước cất (0,75 mL / 0,25 mL), acryloyl clorua (6,0 uL, 0,1 mmol) được bổ sung vào đó ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi bổ sung etyl axetat, nước cất được bổ sung và lớp hữu cơ được tách. Lớp hữu cơ đã tách được xử lý bằng natri sulfat, được lọc và được cô dưới điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được tách bằng kỹ thuật sắc ký cột để thu được 13,1 mg (hiệu suất: 39,7%) hợp chất nêu ở tiêu đề.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,84-7,83(m, 1H), 7,48(s, 1H), 6,84-6,52(m, 2H), 6,45-6,44(m, 1H), 6,24-6,06(m, 1H), 5,77-5,56(m, 1H), 4,59-4,41(m, 1H), 4,11-3,91(m, 3H), 3,34(s, 3H), 3,29-3,00(m, 1H), 2,18-2,11(m, 1H), 1,85-1,72(m, 3H), 1,42-1,38(m, 3H), 1,34-1,33(m, 1H),

1,25-1,23(m, 3H)

Ví dụ thử nghiệm 1: Đo hoạt tính ức chế đối với enzym JAK3 và BTK

Các hoạt tính ức chế kinaza JAK3 và BTK được đo đối với các hợp chất được điều chế trong các ví dụ thông qua phân tích in vitro trên nền tảng ADP Glow (Glo).

Đặc biệt là, hoạt tính ức chế đối với JAK3 và BTK kinaza được đo sử dụng bộ kit thử nghiệm JAK3 kinaza (Promega, V9441) và bộ kit thử nghiệm BTK kinaza (Promega, V9071) được mua từ Promega. JAK3 và BTK ở người được tinh chế tái tổ hợp được pha loãng bằng đệm phản ứng 1 x kinaza (JAK3: Tris-Cl 40 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 0,1 mg/mL BSA và DTT 50 uM/BTK: Tris-Cl 40 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 0,1 mg/mL BSA, MnCl<sub>2</sub> 2 mM và DTT 50 uM) và bổ sung vào đĩa có 96 lỗ (JAK3: nồng độ cuối là 4 ng mỗi phản ứng/BTK: nồng độ cuối là 8 ng mỗi phản ứng). Hợp chất được điều chế trong các ví dụ trước được xử lý để cuối cùng tạo thành dung dịch nước DMSO 1%, và dung dịch hỗn hợp thuốc chất nền chứa ATP (JAK3: nồng độ cuối là 5 uM/BTK: nồng độ cuối là 10 uM) và 0,2 ug/uL Poly(Glu4, Tyr1)peptit (nồng độ cuối JAK3 và BTK) trong tổng số 25 uL chất phản ứng được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ vào phản ứng enzym ban đầu. Sau khi ủ (30°C) trong 1 giờ, thể tích đương lượng (25 uL mỗi phản ứng) của ADP Glo được bổ sung và được ủ (30°C) trong 40 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, chất dò kinaza (50 uL mỗi phản ứng) được bổ sung và được ủ (30°C) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Hoạt tính kinaza được đo bằng hóa phát quang theo hướng dẫn của bộ kit thử nghiệm kinaza ADP Glo, và hoạt tính ức chế của các hợp chất theo sáng chế được tính toán. Để phân tích các kết quả của mỗi hợp chất, Microsoft Excel được sử dụng, và các giá trị IC<sub>50</sub> được tính toán bằng phần mềm SigmaPlot. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1 bên



dưới. Ngoài ra, để so sánh, Tofacitinib và Ibrutinib được đánh giá theo cách tương tự.

Bảng 1

| Ví dụ       | JAK3 IC <sub>50</sub><br>(nM) | BTK IC <sub>50</sub><br>(nM) |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1           | 0,3                           | 1,2                          |
| 2           | 0,4                           | 1,3                          |
| 3           | 1,8                           | 3,5                          |
| 4           | 2,2                           | 5,4                          |
| 5           | 1,2                           | 5,3                          |
| 6           | 0,6                           | 3,4                          |
| 7           | 0,3                           | 1,6                          |
| 8           | 0,3                           | 1,8                          |
| 9           | 0,3                           | 2,0                          |
| 10          | 2,4                           | 3,3                          |
| 11          | 5,7                           | 0,9                          |
| Tofacitinib | 3,5                           | -                            |
| Ibrutinib   | -                             | 0,6                          |

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm tế bào trung gian bởi JAK3 (thử nghiệm HT-2/IL-2)

Hoạt tính ức chế đối với JAK3 kinaza ở cấp độ tế bào được đo đối với hợp chất được điều chế trong các ví dụ thông qua phân tích in vitro STAT5 phosphoryl hóa gây ra bởi việc kích thích IL-2 trong tế bào HT-2. Đặc biệt là, phosphoryl hóa STAT5 được phân tích bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm HTRF®phospho-STAT5 (Tyr694) (Cisbio, 64AT5PEG), được mua từ Cisbio. Các tế bào HT-2 được nuôi cấy trong 2 giờ trong môi trường không có yếu tố tăng trưởng. Các tế bào HT-2 đã nuôi cấy được phân phối vào đĩa có 96 lỗ bằng 50 ul để có mật độ là  $2,5 \times 10^5$  tế bào/lỗ. Hợp chất được điều chế trong các ví dụ trước đó được điều chế để cuối cùng là dung dịch chứa nước 0,3% DMSO, và các tế bào HT-2 được xử lý bằng hợp chất trong 30 phút. Sau khi xử lý hợp chất, IL-2 được

điều chế đến nồng độ cuối cùng là 20 ng/ml, và các tế bào HT-2 được xử lý trong 10 phút. Các tế bào sau đó được phá vỡ bằng cách xử lý đệm phân giải trong 30 phút. Mức độ của STAT5 phosphoryl hóa được đo theo hướng dẫn của bộ kit thử nghiệm HTRF® phospho-STAT5, và hoạt tính ức chế của hợp chất theo sáng chế được tính toán. Để phân tích kết quả của mỗi hợp chất, Microsoft Excel được sử dụng, và các giá trị  $IC_{50}$  được tính toán bằng phần mềm SigmaPlot.

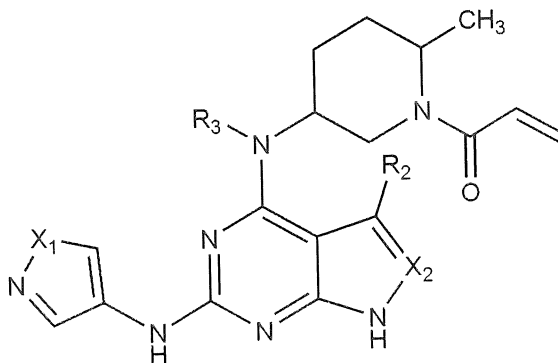
Bảng 2

| Ví dụ | $IC_{50}$ tế bào JAK3<br>(nM) |
|-------|-------------------------------|
| 1     | 90,9                          |
| 2     | 360,4                         |

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức hóa học 1 sau, hoặc muối được dụng của nó:

Công thức hóa học 1



trong đó, trong công thức hóa học 1,

$X_1$  là N- $R_1$ , O, hoặc S,

$X_2$  là CH, hoặc N,

$R_1$  là etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, hoặc 2-((tert-butoxycacbonyl)amino)etyl,

$R_2$  là hydro,  $C_{1-5}$  alkyl, hoặc halogen, và

$R_3$  là hydro hoặc  $C_{1-5}$  alkyl.

2. Hợp chất hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó  $R_2$  là hydro, metyl, brom, flo, hoặc clo.

3. Hợp chất hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó  $R_3$  là hydro, metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, isopentyl, hoặc neopentyl.

4. Hợp chất hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó  $X_1$  là N- $R_1$  và  $X_2$  là CH.

5. Hợp chất hoặc muối được dụng của nó được chọn từ nhóm bao gồm sau

đây:

- 1) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 2) 1-((2S,5R)-5-((2-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 3) 1-((2S,5R)-5-((2-((1-isobutyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 4) 1-((2S,5R)-5-((2-((1-xyclopentyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 5) tert-butyl 2-(4-((4-((3R,6S)-1-acryloyl-6-metylpiperidin-3-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-2-yl)amino)-1H-pyrazol-1-yl)etylcarbamat,
- 6) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-(isothiazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 7) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-(2,2-difloroetyl)-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 8) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-(2,2,2-trifloroetyl)-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,
- 9) 1-((2S,5R)-5-((5-clo-2-((1-xyclopropyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-metylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on,

10) 1-((2S,5R)-5-((2-(1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)(methylamino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on, and

11) 1-((2S,5R)-5-((3-clo-6-((1-ethyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)(methylamino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-on.

6. Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh tăng sinh, bệnh tăng sinh quá mức, bệnh do hệ miễn dịch, ung thư hoặc khối u, chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc muối được dụng của nó.