



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

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

(11) 
1-0019773

(51)⁷ **C07D 487/04, A61K 31/4985, A61P**
25/28

(13) **B**

(21) 1-2013-02714

(22) 29.02.2012

(86) PCT/EP2012/053455 29.02.2012

(87) WO2012/117027 07.09.2012

(30) 11156463.9 01.03.2011 EP

(45) 25.09.2018 366

(43) 25.03.2014 312

(73) JANSSEN PHARMACEUTICA NV (BE)

Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Belgium

(72) TRABANCO-SUAREZ, Andrés, Avelino (ES), GIJSEN, Henricus, Jacobus, Maria (NL), VAN GOOL, Michiel, Luc, Maria (BE), VEGA RAMIRO, Juan, Antonio (ES), DELGADO-JIMENEZ, Francisca (ES)

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

(54) **HỢP CHẤT 6,7-DIHYDRO-PYRAZOLO[1,5-A]PYRAZIN-4-YLAMIN DÙNG LÀM CHẤT ỨC CHẾ BETA-SECRETASA (BACE), DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY VÀ QUY TRÌNH BÀO CHẾ DƯỢC PHẨM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất 6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-yl-amin dùng làm chất ức chế beta-secretaza, còn được gọi là enzym phân cắt phân tử dạng amyloid ở vị trí beta, BACE, BACE1, Asp2, hoặc memapsin2. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này, quy trình điều chế hợp chất và bào chế dược phẩm nêu trên dùng để ngăn ngừa và điều trị các rối loạn có liên quan đến beta-secretaza, như bệnh Alzheimer (AD), bệnh suy giảm nhận thức nhẹ, tình trạng lão suy, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với đột quỵ, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson hoặc bệnh sa sút trí tuệ có liên quan đến dạng beta-amyloid.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất 6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-yl-amin dùng làm các chất ức chế beta-secretaza, còn được biết đến là enzym phân cắt phân tử dạng amyloid ở vị trí beta, BACE, BACE1, Asp2, hoặc memapsin2. Sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm chứa hợp chất này, quy trình điều chế các hợp chất và dược phẩm để ngăn ngừa và điều trị các rối loạn trong đó liên quan đến beta-secretaza, như bệnh Alzheimer (AD), bệnh suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh lão suy, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với đột quỵ, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson hoặc bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer (AD) là bệnh thoái hóa thần kinh có liên quan đến độ tuổi. Những bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer bị thiếu hụt nhận thức và mất trí nhớ cũng như các vấn đề về hành vi như lo âu. Trên 90% bệnh nhân bị mắc bệnh Alzheimer có dạng rối loạn không thường xuyên này trong khi dưới 10% trường hợp là bệnh có tính chất gia đình hoặc do di truyền. Ở Mỹ, cứ 10 người ở tuổi 65 thì có một người mắc bệnh AD trong khi ở tuổi 85, cứ hai người thì có một người mắc bệnh AD. Thời gian sống thêm trung bình kể từ khi chẩn đoán ban đầu là 7-10 năm, và những bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer cần chăm sóc đặc biệt hoặc bằng thiết bị hỗ trợ sống rất đắt đỏ hoặc cần sự trợ giúp của các thành viên trong gia đình. Với việc tăng số người cao tuổi trong cộng đồng dân cư, bệnh AD là vấn đề y tế đáng báo động. Những phương pháp trị liệu hiện có đối với bệnh AD chỉ là điều trị các triệu chứng bệnh và bao gồm các chất ức chế axetylcholinesteraza để cải thiện chức năng nhận thức cũng như thuốc chống lo âu và thuốc chống loạn tâm thần để kiểm soát các vấn đề về hành vi đi kèm với bệnh này.

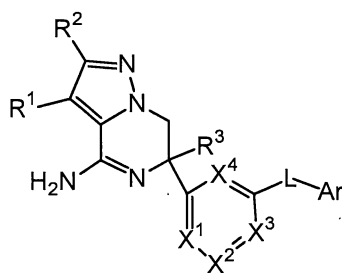
Dấu hiệu bệnh lý đặc trưng trong não của những bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer là các mớ rối sợi thần-kinh mà được tạo ra bởi quá trình siêu phosphoryl hóa của protein tau và các mảng bám dạng amyloid mà tạo ra do sự kết tụ peptit dạng beta-amyloid 1-42 (Abeta 1-42). Abeta 1-42 tạo thành các oligome và sau đó là các sợi, và cuối cùng là các mảng bám dạng amyloid. Các oligome và các sợi này được cho là đặc biệt gây độc thần

kinh và có thể gây ra hầu hết tổn thương thần kinh đi kèm với AD. Các tác nhân mà ngăn ngừa sự hình thành của Abeta 1-42 có khả năng là các tác nhân cải biến bệnh dùng để điều trị bệnh AD.

Abeta 1-42 được tạo ra từ protein tiền chất dạng amyloid (APP), gồm 770 axit amin. Đầu tận cùng N của Abeta 1-42 được phân cắt bởi beta-secretaza (BACE), và sau đó gamma-secretaza phân cắt đầu tận C. Ngoài Abeta 1-42, gamma-secretaza cũng giải phóng Abeta 1-40 là sản phẩm phân cắt chiếm ưu thế cũng như Abeta 1-38 và Abeta 1-43. Các dạng Abeta này cũng có thể kết tụ để tạo thành các oligome và các sợi. Như vậy, các chất ức chế BACE sẽ được mong đợi là ngăn ngừa sự hình thành của Abeta 1-42 cũng như Abeta 1-40, Abeta 1-38 và Abeta 1-43 và sẽ là tác nhân điều trị có hoạt lực để điều trị bệnh AD.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm ra hợp chất có tác dụng điều trị một cách hiệu quả bệnh AD. Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



hoặc tautome hoặc dạng đồng phân lập thể của nó, trong đó:

R^1 và R^2 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halo, xyano, C_{1-3} alkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^3 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C_{1-3} alkyl, C_{3-6} xycloalkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl, homoaryl và heteroaryl;

X^1 , X^2 , X^3 , X^4 độc lập là $C(R^4)$ hoặc N, với điều kiện là không quá hai nhóm trong số đó là N; mỗi R^4 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halo, C_{1-3} alkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl, xyano, C_{1-3} alkyloxy, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy;

L là một liên kết hoặc $-N(R^5)CO-$, trong đó R^5 là hydro hoặc C_{1-3} alkyl;

Ar là homoaryl hoặc heteroaryl;

trong đó homoaryl là phenyl hoặc phenyl được thế bằng một, hai hoặc ba phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C₁₋₃alkyl, C₁₋₃alkyloxy, mono- và polyhalo-C₁₋₃alkyl, mono- và polyhalo-C₁₋₃alkyloxy;

heteroaryl được chọn từ nhóm bao gồm pyridyl, pyrimidyl, pyrazyl, pyridazyl, furanyl, thienyl, pyrrolyl, pyrazolyl, imidazolyl, triazolyl, thiazolyl, thiadiazolyl, oxazolyl, và oxadiazolyl, mỗi nhóm tùy ý được thế bằng một, hai hoặc ba phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C₁₋₃alkyl, C₁₋₃alkyloxy, mono- và polyhalo-C₁₋₃alkyl, mono- và polyhalo-C₁₋₃alkyloxy;

hoặc muối cộng hoặc solvat của nó.

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa chất mang dược dụng và hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế bằng cách trộn hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên và chất mang dược dụng. Sáng chế đề xuất quy trình bào chế được phẩm bao gồm việc trộn hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên và chất mang dược dụng.

Tác giả sáng chế cũng mô tả các phương pháp điều trị rối loạn do enzym beta-secretaza, gây ra bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất hoặc dược phẩm nêu trên.

Tác giả sáng chế cũng mô tả các phương pháp ức chế enzym beta-secretaza, bao gồm việc cho đối tượng cần ức chế enzym này dùng một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất hoặc dược phẩm nêu trên.

Một ví dụ của sáng chế là phương pháp điều trị rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh lão suy, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với đột quy, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson và bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid, tốt hơn là bệnh Alzheimer, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị lượng dùng có tác dụng điều trị của hợp chất hoặc dược phẩm bất kỳ nêu trên.

Ví dụ khác nữa của sáng chế là hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên để sử dụng trong việc điều trị: (a) bệnh Alzheimer, (b) bệnh suy giảm nhận thức nhẹ, (c) bệnh lão suy, (d) bệnh sa sút trí tuệ, (e) bệnh sa sút trí tuệ thể Lewy, (f) hội chứng Down,

(g) bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với đột quỵ, (h) bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson và (i) bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid, ở đối tượng cần điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các hợp chất có công thức (I) như được xác định trên đây, và các muối được dụng và các solvat của nó. Các hợp chất có công thức (I) là các chất ức chế enzym beta-secretase (còn được biết đến là enzym phân cắt ở vị trí beta, BACE, BACE1, Asp2 hoặc memapsin 2), và có tác dụng điều trị bệnh Alzheimer, bệnh suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh lão suy, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với đột quỵ, bệnh sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson và bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid, tốt hơn là bệnh Alzheimer, bệnh suy giảm nhận thức nhẹ hoặc bệnh sa sút trí tuệ, tốt hơn nữa là bệnh Alzheimer.

Theo một phương án của sáng chế, R^1 và R^2 độc lập được chọn từ hydro và C_{1-3} alkyl;

X^1 , X^2 , X^3 , X^4 độc lập là $C(R^4)$ trong đó mỗi R^4 được chọn từ hydro và halo;

L là một liên kết hoặc $-N(R^5)CO-$, trong đó R^5 là hydro;

Ar là homoaryl hoặc heteroaryl;

trong đó homoaryl là phenyl hoặc phenyl được thế bằng một hoặc hai phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkyloxy, và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy;

heteroaryl được chọn từ nhóm bao gồm pyridyl, pyrimidyl, và pyrazyl, mỗi nhóm tùy ý được thế bằng một hoặc hai phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkyloxy, và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy;

hoặc muối cộng hoặc solvat của nó.

Theo một phương án khác của sáng chế, R^1 và R^2 là hydro;

X^1 , X^2 , X^3 , X^4 là CH;

L là một liên kết hoặc $-N(R^5)CO-$, trong đó R^5 là hydro;

Ar là homoaryl hoặc heteroaryl;

trong đó homoaryl là phenyl được thế bằng clo;

heteroaryl được chọn từ nhóm bao gồm pyridyl và pyrimidyl, mỗi nhóm tùy ý được thế bằng một hoặc hai phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm clo, flo, xyano, metyl, và metoxy;

hoặc muối cộng hoặc solvat của nó.

Theo một phương án khác nữa, nguyên tử cacbon được thế bằng R^3 có cấu hình R.

ĐỊNH NGHĨA

“Halo” dùng để chỉ flo, clo và brom; “ C_{1-3} alkyl” dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1, 2 hoặc 3 nguyên tử cacbon, ví dụ metyl, etyl, 1-propyl và 2-propyl; “ C_{1-3} alkyloxy” dùng để chỉ gốc ete, trong đó C_{1-3} alkyl là như được xác định trên đây; “mono- và polyhalo C_{1-3} alkyl” dùng để chỉ C_{1-3} alkyl như được xác định trên đây, được thế bằng 1, 2, 3 hoặc nơi có thể được thế bằng nhiều nguyên tử halo như được xác định trên đây; “mono- và polyhalo C_{1-3} alkyloxy” dùng để chỉ gốc ete trong đó mono- và polyhalo C_{1-3} alkyl là như được xác định trên đây; “ C_{3-6} xycloalkyl” dùng để chỉ xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl và xyclohexyl; “ C_{3-6} xycloalkandiyl” dùng để chỉ gốc hóa trị hai như xyclopropandiyl, xyclobutandiyl, xyclopentandiyl và xyclohexan-diyl.

Thuật ngữ “đối tượng” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ động vật, tốt hơn là động vật có vú, tốt nhất là người, là đối tượng hoặc đã là đối tượng điều trị, nghiên cứu hoặc thử nghiệm.

Thuật ngữ “lượng có tác dụng điều trị” như được sử dụng ở đây, có nghĩa là lượng hoạt chất hoặc dược chất tạo ra đáp ứng sinh học hoặc y học trong hệ mô, động vật hoặc con người mà được các nhà nghiên cứu, bác sĩ thú y, bác sĩ y khoa hoặc thầy thuốc lâm sàng khác mong muốn, mà bao gồm việc làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn đang được điều trị.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chế phẩm” được dự định bao gồm sản phẩm chứa các thành phần cụ thể với lượng cụ thể, cũng như sản phẩm bất kỳ mà tạo ra, trực tiếp hoặc gián tiếp, từ việc kết hợp các thành phần cụ thể với lượng cụ thể.

Trên đây hoặc sau đây, thuật ngữ “hợp chất có công thức (I)” có nghĩa là bao gồm các muối cộng, các solvat và các dạng đồng phân lập thể của chúng.

Thuật ngữ “đồng phân lập thể” hoặc “dạng đồng phân hóa học lập thể” ở trên hoặc dưới đây được sử dụng thay thế nhau.

Sáng chế bao gồm tất cả chất đồng phân lập thể của hợp chất có công thức (I) dưới dạng chất đồng phân lập thể tinh khiết hoặc dưới dạng hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều chất đồng phân lập thể.

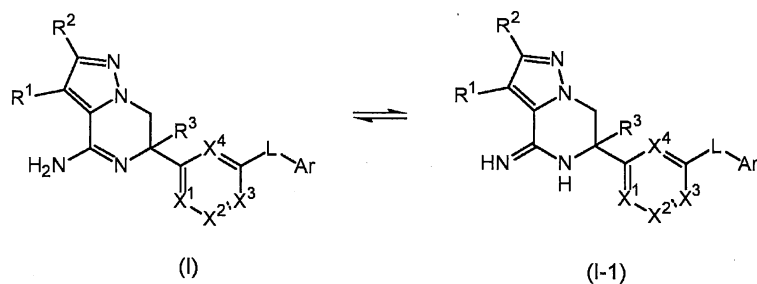
Các chất đồng phân đối ảnh là các chất đồng phân lập thể mà là hình ảnh qua gương không thể xếp chồng lên nhau. Hỗn hợp gồm một cặp chất đồng phân đối ảnh theo tỷ lệ 1:1 là raxemat hoặc hỗn hợp raxemic.

Các chất đồng phân không đối quang (hoặc chất đồng phân không đối quang) là chất đồng phân lập thể mà không phải là chất đồng phân đối ảnh, tức là chúng không có mối quan hệ với nhau dưới dạng ảnh qua gương. Nếu hợp chất chứa liên kết đôi, các phân tử thể có thể có cấu hình E hoặc Z. Nếu hợp chất chứa nhóm xycloalkyl được thế hai lần, thì các phân tử thể có thể có cấu hình *cis* hoặc *trans*. Do đó, sáng chế bao gồm chất đồng phân đối ảnh, các chất đồng phân không đối quang, các raxemat, chất đồng phân E, chất đồng phân Z, chất đồng phân *cis*, chất đồng phân *trans* và các hỗn hợp của chúng.

Cấu hình tuyệt đối được xác định theo hệ thống Cahn-Ingold-Prelog. Cấu hình ở nguyên tử không đối xứng được xác định bằng R hoặc S. Các hợp chất đã được phân giải mà cấu hình tuyệt đối của nó chưa biết có thể được ký hiệu bằng (+) hoặc (-) tùy thuộc vào hướng trong đó chúng mặt phẳng ánh sáng phân cực phẳng.

Khi chất đồng phân lập thể cụ thể được xác định, điều này có nghĩa là chất đồng phân lập thể đã nêu gần như không chứa, tức là chứa ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10%, thậm chí tốt hơn nữa là ít hơn 5%, cụ thể ít hơn 2% và tốt nhất là ít hơn 1%, các chất đồng phân khác. Như vậy, khi hợp chất có công thức (I) ví dụ được chỉ rõ là (R), thì điều này có nghĩa là hợp chất này gần như không chứa chất đồng phân (S); khi hợp chất có công thức (I) ví dụ được chỉ rõ là E, thì điều này có nghĩa là hợp chất này gần như không chứa chất đồng phân Z; khi hợp chất có công thức (I) ví dụ được quy định là *cis*, điều này có nghĩa là hợp chất này gần như không có chất đồng phân *trans*.

Các hợp chất có công thức (I) cùng tồn tại với các chất tautome có công thức (I-1) ở trạng thái cân bằng động:



Hơn nữa, một số dạng kết tinh trong số các dạng kết tinh của các hợp chất của sáng chế có thể tồn tại dưới dạng chất đa hình và các dạng này được dự định bao gồm trong sáng chế. Ngoài ra, một số hợp chất trong số các hợp chất của sáng chế có thể tạo thành các solvat với nước (tức là các hydrat) hoặc các dung môi hữu cơ thông dụng, và các solvat này cũng được dự định bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Để sử dụng trong y tế, các muối của các hợp chất theo sáng chế chỉ “các muối được dụng” không độc. Tuy nhiên, các muối khác có thể hữu ích trong việc điều chế các hợp chất theo sáng chế hoặc các muối được dụng của chúng. Các muối được dụng thích hợp của các hợp chất này bao gồm các muối cộng axit mà có thể là ví dụ, được tạo thành bằng cách trộn dung dịch của hợp chất này với dung dịch axit được dụng như axit clohydric, axit sulfuric, axit fumaric, axit maleic, axit succinic, axit axetic, axit benzoic, axit xitric, axit tartaric, axit cacbonic hoặc axit phosphoric. Hơn nữa, khi các hợp chất theo sáng chế mang gốc axit, thì các muối được dụng thích hợp của nó có thể bao gồm các muối kim loại kiềm, ví dụ, các muối natri hoặc kali; các muối kim loại kiềm thổ, chẳng hạn, các muối canxi hoặc magie; và các muối được tạo thành với các phối tử hữu cơ thích hợp, chẳng hạn, các muối amoni bậc bốn.

Các axit điển hình mà có thể được sử dụng trong việc điều chế các muối được dụng bao gồm, nhưng không chỉ hạn chế ở, các axit sau: axit axetic, axit 2,2-dicloaxetic, axit amin được axyl hóa, axit adipic, axit alginic, axit ascorbic, axit L-aspartic, axit benzensulfonic, axit benzoic, axit 4-axetamidobenzoic, axit (+)-camphoric, axit camphorsulfonic, axit capric, axit caproic, axit caprylic, axit xinnamic, axit xitric, axit xyclamic, axit etan-1,2-disulfonic, axit etansulfonic, axit 2-hydroxy-etansulfonic, axit formic, axit fumaric, axit galactaric, axit gentisic, axit gluco-heptonic, axit D-gluconic, axit D-glucoronit, axit L-glutamic, axit beta-oxo-glutaric, axit glycolic, axit hippuric, axit hydrobromic, axit clohydric, axit (+)-L-lactic, axit (±)-DL-lactic, axit lactobionic, axit maleic, axit (-)-L-malic, axit malonic, axit (±)-DL-mandelic, axit metansulfonic, axit

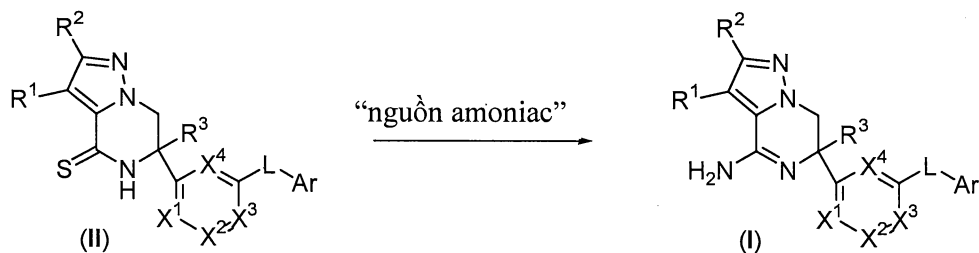
naphtalen-2-sulfonic, axit naphtalen-1,5-disulfonic, axit 1-hydroxy-2-naphthoic, axit nicotinic, axit nitric, axit oleic, hoặc axit otic, axit oxalic, axit palmitic, axit pamoic, axit phosphoric, axit L-pyroglutamic, axit salixylic, axit 4-amino-salixylic, axit sebacic, axit stearic, axit suxinic, axit sulfuric, axit tannic, axit (+)-L-tartric, axit thioxyanic, axit p-toluensulfonic, axit triflometylsulfonic, và axit undexylenic. Các bazơ đại diện mà có thể được sử dụng trong việc điều chế các muối được dùng bao gồm, nhưng không chỉ hạn chế ở, các bazơ sau: amoniac, L-arginin, benetamin, benzathin, canxi hydroxit, cholin, dimetyletanolamin, dietanolamin, dietylamin, 2-(diethylamino)-etanol, etanolamin, etylen-diamin, *N*-metyl-glucamin, hydrabamin, 1*H*-imidazol, L-lysin, magie hydroxit, 4-(2-hydroxyetyl)-morpholin, piperazin, kali hydroxit, 1-(2-hydroxyetyl)-pyrrolidin, amin bậc hai, natri hydroxit, trietanolamin, trometamin và kẽm hydroxit.

Tên hóa học của các hợp chất theo sáng chế là được gọi theo quy tắc tạo danh pháp được Chemical Abstracts Service chấp thuận. Một số hợp chất trong số các hợp chất có công thức (I) cũng có thể tồn tại dưới dạng tautome của chúng. Các dạng này mặc dù không được nêu một cách rõ ràng trong công thức nêu trên nhưng chúng cũng được dự định bao gồm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

A. Điều chế hợp chất cuối cùng

Quy trình thử nghiệm 1

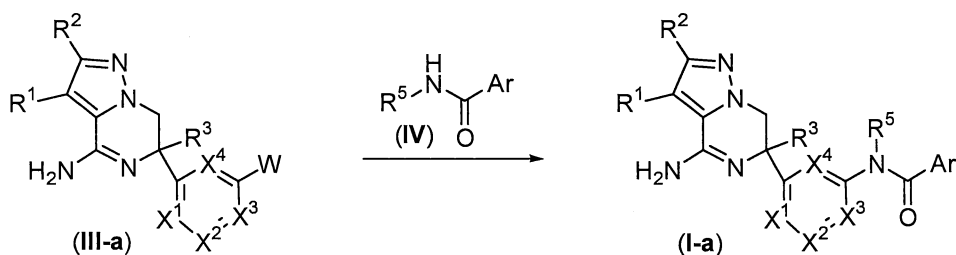
Các hợp chất cuối cùng có công thức (I), có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (II) phản ứng với nguồn amoniac thích hợp ví dụ, amoni clorua hoặc nước amoniac, theo sơ đồ phản ứng (1), phản ứng được thực hiện trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, nước hoặc metanol, trong điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 90°C, ví dụ trong khoảng thời gian từ 4 đến 100 giờ. Trong sơ đồ phản ứng (1), tất cả các biến số được xác định như trong công thức (I).



Sơ đồ phản ứng 1

Quy trình thử nghiệm 2

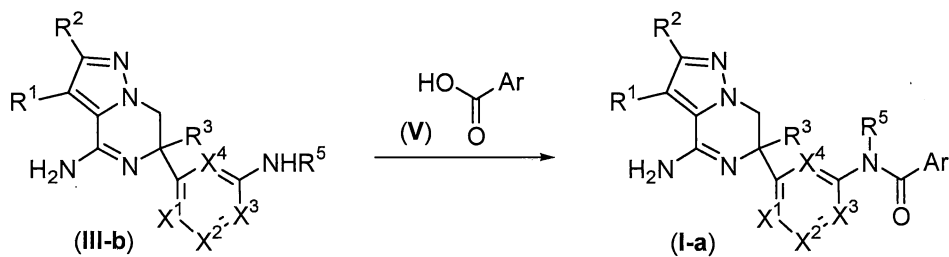
Các hợp chất cuối cùng có công thức (I-a), trong đó L là $-N(R^5)CO-$, có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (III-a) phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (IV) theo sơ đồ phản ứng (2), phản ứng được thực hiện trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, *N,N*-dimetylformamit, với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, K_3PO_4 , chất xúc tác đồng ví dụ, CuI và diamin như (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-diaminoxyclohexan, trong điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 180°C, ví dụ trong 135 phút trong điều kiện chiếu vi sóng. Trong sơ đồ phản ứng (2), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I) và W là halo.



Sơ đồ phản ứng 2

Quy trình thử nghiệm 3

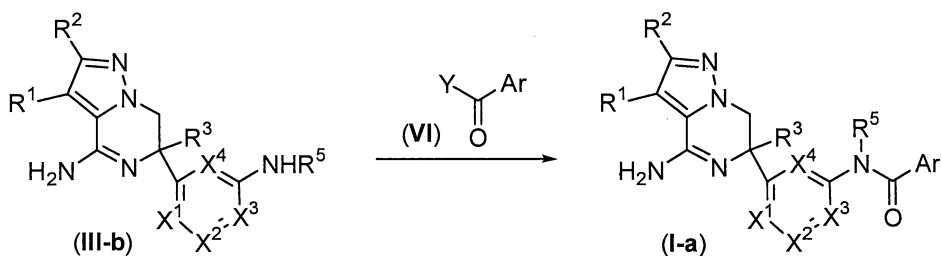
Ngoài ra, các hợp chất cuối cùng có công thức (I-a), có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (III-b) phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (V) theo sơ đồ phản ứng (3), phản ứng được thực hiện trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, diclometan hoặc metanol, tùy ý với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, *N,N*-diisopropyletylamin, với sự có mặt của tác nhân ngưng tụ như *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroni hexaflophosphat hoặc 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua trong điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 25°C, ví dụ trong 2 giờ. Trong sơ đồ phản ứng (3), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I).



Sơ đồ phản ứng 3

Quy trình thử nghiệm 4

Ngoài ra, các hợp chất cuối cùng có công thức (I-a), có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (III-b) phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (VI) theo sơ đồ phản ứng (4), phản ứng được thực hiện trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, diclometan, với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, pyridin, trong điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 25°C, ví dụ trong 2 giờ. Trong sơ đồ phản ứng (4), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I) và Y là halo.

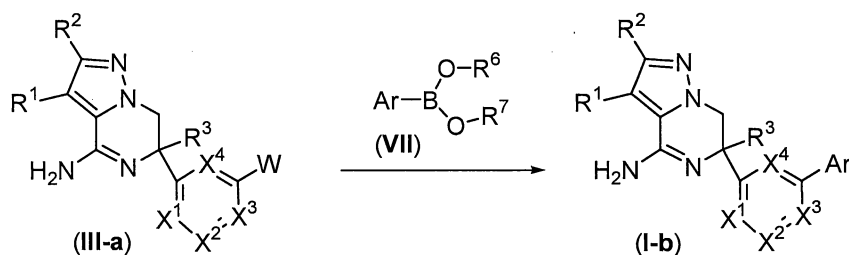


Sơ đồ phản ứng 4

Quy trình thử nghiệm 5

Các hợp chất cuối cùng có công thức (I-b) trong đó L là một liên kết, có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (III-a) phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (VII) theo sơ đồ phản ứng (5), phản ứng được thực hiện trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, hỗn hợp gồm các dung môi không phản ứng như, 1,4-dioxan/etanol, với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, K₂CO₃, chất xúc tác phức Pd như, tetrakis (triphenylphosphin)paladi (0) trong các điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 80°C, ví dụ trong 20 giờ hoặc ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 150°C, trong khoảng thời gian từ 10 phút đến 30 phút trong điều kiện chiếu vi sóng. Trong sơ đồ phản ứng (5), tất cả các biến số là được xác định như trong hợp chất có công thức (I) và W là halo. R⁶ và R⁷ có thể là hydro hoặc alkyl, hoặc có

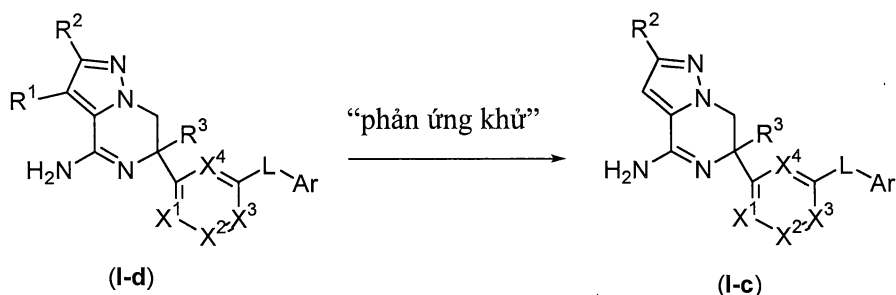
thể cùng nhau tạo ra, ví dụ, gốc hóa trị hai có công thức $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.



Sơ đồ phản ứng 5

Quy trình thử nghiệm 6

Các hợp chất cuối cùng có công thức (I-c), trong đó R^1 là hydro, có thể được điều chế từ các hợp chất cuối cùng tương ứng có công thức (I-d), trong đó R^1 được chọn từ nhóm bao gồm clo, brom và iot, theo các quy trình khử đã biết trong lĩnh vực này theo sơ đồ phản ứng (6). Ví dụ, phản ứng khử có thể được thực hiện bằng cách khuấy các chất phản ứng trong khí quyển hydro và với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp ví dụ, paladi trên than, platin trên than, Raney-niken và các chất xúc tác tương tự. Dung môi thích hợp là, ví dụ, nước, các alkanol, ví dụ metanol, etanol và dung môi tương tự, các este, ví dụ etyl axetat và dung môi tương tự. Để làm tăng tốc độ của phản ứng khử đã nêu tốt hơn là làm tăng nhiệt độ và/hoặc áp suất của hỗn hợp phản ứng. Việc hydro hóa tiếp tục không mong muốn của một số nhóm chức trong các chất phản ứng và các sản phẩm phản ứng có thể được ngăn ngừa bằng cách bổ sung chất gây độc chất xúc tác ví dụ, thiophen và dung môi tương tự, vào hỗn hợp phản ứng. Trong sơ đồ phản ứng (6), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I).



Sơ đồ phản ứng 6

Một số hợp chất trung gian và các nguyên liệu ban đầu trong các quy trình điều chế nêu trên là các hợp chất đã biết, các hợp chất này có thể được điều chế theo các

phương pháp đã biết trong lĩnh vực điều chế các hợp chất đã nêu hoặc các hợp chất tương tự và một số hợp chất trung gian là mới. Một số phương pháp điều chế này sẽ được mô tả chi tiết hơn sau đây.

B. Điều chế các hợp chất trung gian

Quy trình thử nghiệm 7

Các hợp chất trung gian có công thức (II) có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (VIII) phản ứng với chất phản ứng cho lưu huỳnh thích hợp để tổng hợp các thioamit ví dụ, phospho pentasulfua hoặc 2,4-bis-(4-metoxypheyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan 2,4-disulfua [chất phản ứng Lawesson] theo sơ đồ phản ứng (7), phản ứng được thực hiện trong dung môi không phản ứng, chẳng hạn, tetrahydrofuran hoặc toluen, với sự có mặt của bazơ thích hợp ví dụ, pyridin, trong các điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C, ví dụ trong 5 giờ. Trong sơ đồ phản ứng (7), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I).

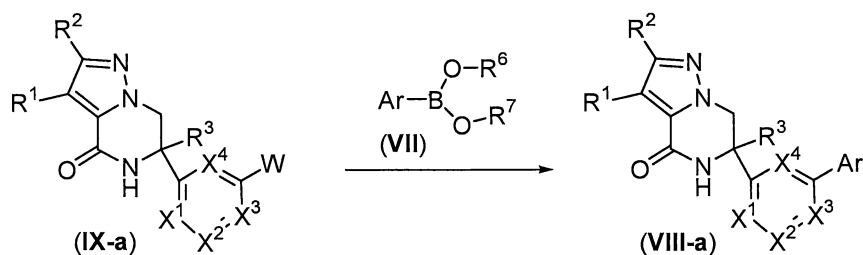


Sơ đồ phản ứng 7

Quy trình thử nghiệm 8

Các hợp chất trung gian có công thức (VIII-a) trong đó L là một liên kết, có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất trung gian có công thức (IX-a) phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (VII) theo sơ đồ phản ứng (8), phản ứng được thực hiện trong hỗn hợp dung môi không phản ứng thích hợp ví dụ, 1,4-dioxan/nước, với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, nước Na_2CO_3 , chất xúc tác phức Pd ví dụ, tetrakis(triphenylphosphin)paladi (0) trong các điều kiện gia nhiệt, ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 80°C, ví dụ trong 20 giờ hoặc ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 150°C, ví dụ trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 phút trong điều kiện chiếu vi sóng. Trong sơ đồ phản ứng (8), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I) và W là halo. R^6 và R^7 có thể là hydro hoặc alkyl, hoặc có thể cùng nhau

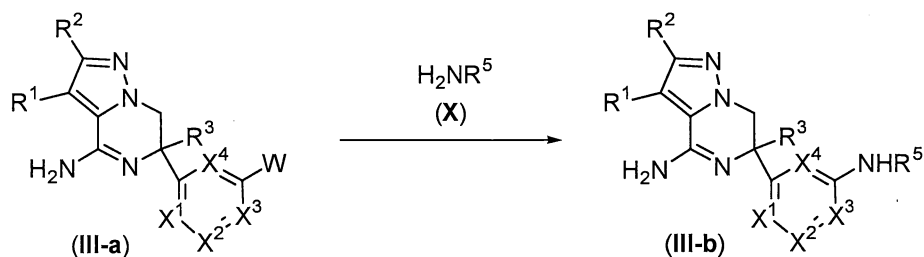
tạo ra, ví dụ gốc hóa trị hai có công thức $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, hoặc $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.



Sơ đồ phản ứng 8

Quy trình thử nghiệm 9

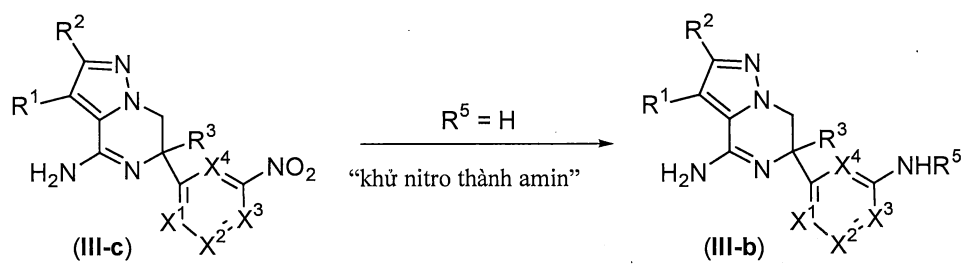
Các hợp chất trung gian có công thức (III-b) có thể được điều chế từ các hợp chất trung gian tương ứng có công thức (III-a) theo các quy trình phản ứng liên hợp kiểu Buchwald-Hartwig đã biết trong lĩnh vực này theo sơ đồ phản ứng (9). Phản ứng liên hợp này có thể được thực hiện bằng cách xử lý các hợp chất trung gian có công thức (III-a) với hợp chất trung gian có công thức (X) trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, etanol hoặc các hỗn hợp gồm các dung môi không phản ứng như, 1,2-dimetoxyetan/nước/etanol, với sự có mặt của bazơ thích hợp, ví dụ, nước K_3PO_4 hoặc Cs_2CO_3 , chất xúc tác phức Pd ví dụ, [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]-diclopaladi(II) hoặc *trans*-bis(dixyclohexylamin) paladi diacetat [DAPCy] trong các điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 80°C , ví dụ trong 20 giờ hoặc ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 130°C , ví dụ trong 10 phút trong điều kiện chiếu vi sóng. Trong sơ đồ phản ứng (9), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I) và W là halo. R^5 là hydro hoặc $\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$. Theo cách khác, khi R^5 là hydro, các hợp chất trung gian có công thức (III-b) cũng có thể thu được theo quy trình tổng hợp hai bước. Thứ nhất, tiến hành phản ứng liên hợp kiểu Buchwald-Hartwig, trong các điều kiện đã được các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, giữa hợp chất trung gian (III-a) và amin ổn định như benzophenon imin. Trong bước thứ hai, hợp chất trung gian (III-b) có thể thu được dưới dạng amin bậc một bằng cách xử lý sản phẩm đã liên hợp, được hòa tan trong dung môi thích hợp, như isopropanol, bằng axit, chẳng hạn axit clohydric, trong các điều kiện gia nhiệt ví dụ gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 25°C , ví dụ trong 2 giờ.



Sơ đồ phản ứng 9

Quy trình thử nghiệm 10

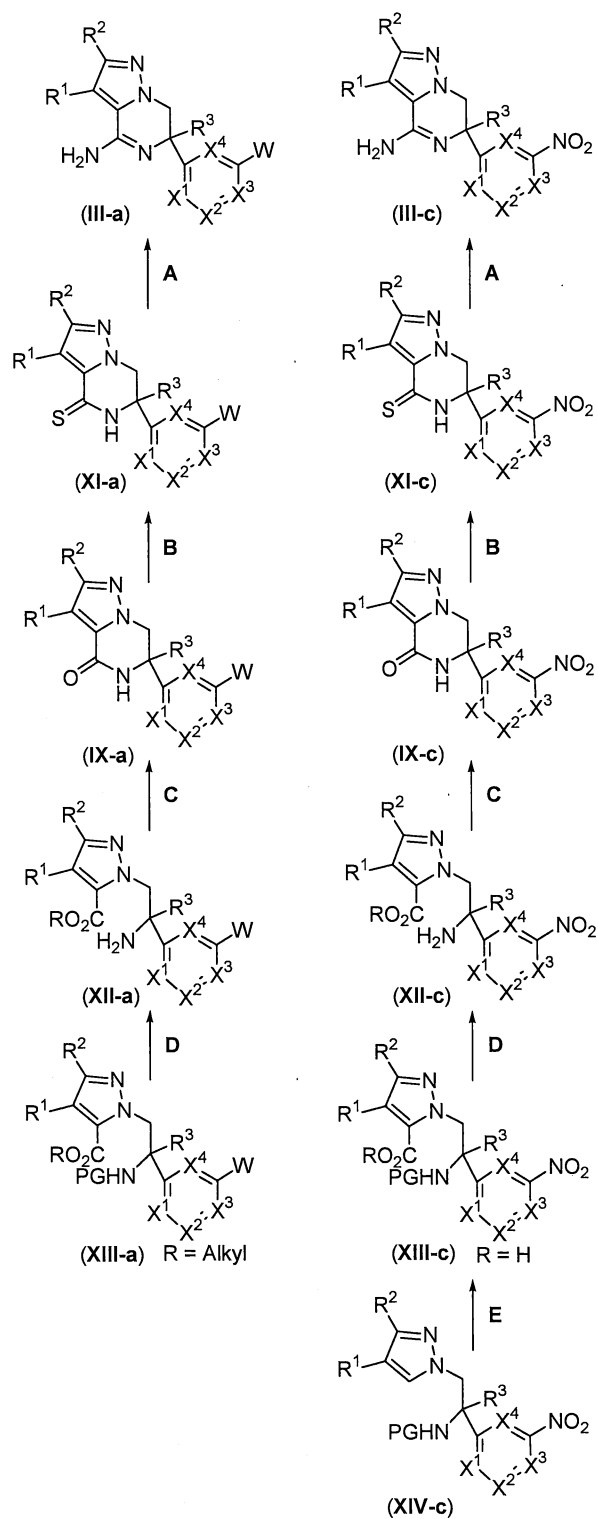
Ngoài ra, các hợp chất trung gian có công thức (III-b), trong đó R^5 là hydro có thể được điều chế từ các hợp chất trung gian tương ứng có công thức (III-c) theo quy trình khử nitro thành amino đã biết trong lĩnh vực theo sơ đồ phản ứng (10). Ví dụ, phản ứng khử đã nêu thường có thể được thực hiện với sự có mặt của tác nhân khử thích hợp như thiếc clorua, kẽm hoặc sắt, trong dung môi không phản ứng thích hợp như ethanol hoặc các hỗn hợp ethanol/axit axetic hoặc metanol/dung dịch nước amoni clorua, trong các điều kiện phản ứng thích hợp, như ở nhiệt độ thuận lợi, thường nằm trong khoảng từ 70°C đến 110°C , trong khoảng thời gian đảm bảo hoàn thành phản ứng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá được rằng trong trường hợp nếu R^1 và/hoặc R^2 trong hợp chất trung gian (III-c) là halogen được chọn từ nhóm clo, brom và iot, và các nhóm này không mong muốn có mặt trong hợp chất cuối cùng, trong các điều kiện nêu trên còn có thể xảy ra phản ứng proton hóa-cộng oxi hóa, để tạo ra hợp chất trung gian (III-b), trong đó R^1 và/hoặc R^2 là hydro. Theo cách khác, phản ứng khử đã nêu có thể được thực hiện bằng cách khuấy các chất phản ứng trong khí quyển hydro và với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp ví dụ, paladi trên than, platin trên than, Raney-niken và các chất xúc tác tương tự. Dung môi thích hợp là, ví dụ, nước, các alkanol, ví dụ metanol, ethanol và rượu tương tự, các este, ví dụ etyl axetat và các este tương tự. Để làm tăng tốc độ của phản ứng khử đã nêu, tốt hơn là làm tăng nhiệt độ và/hoặc áp suất của hỗn hợp phản ứng. Sự hydro hóa tiếp tục không mong muốn của một số nhóm chức trong các chất phản ứng và các sản phẩm phản ứng có thể được tránh bằng cách bổ sung chất gây độc chất xúc tác ví dụ, thiophen và các chất tương tự, vào hỗn hợp phản ứng. Trong sơ đồ phản ứng (10), tất cả các biến số được xác định như trong hợp chất có công thức (I).



Sơ đồ phản ứng 10

Quy trình thử nghiệm 11

Các hợp chất có công thức (III-a) và (III-c) thường có thể được điều chế theo các bước phản ứng được thể hiện trong các sơ đồ phản ứng (11) và (12) dưới đây.



Sơ đồ phản ứng 11

A: Chuyển hóa thioamit thành amidin

B: Chuyển hóa amit thành thioamit (sự lưu huỳnh hóa)

C: Đóng vòng

D: Loại bỏ các nhóm bảo vệ N bất kỳ

E: Thế nguyên tử hydro bằng kim loại

Các dẫn xuất amidin trong sơ đồ phản ứng (11) ở trên thường có thể được điều chế từ các dẫn xuất thioamit tương ứng theo các quy trình chuyển hóa thioamit thành amidin đã biết trong lĩnh vực (bước phản ứng A). Sự chuyển hóa này thường có thể được thực hiện bằng cách xử lý các thioamit đã nêu bằng nguồn amoniac ví dụ, amoni clorua hoặc nước amoniac, trong dung môi không phản ứng thích hợp ví dụ, nước hoặc metanol và dung môi tương tự, trong các điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 90°C, ví dụ trong khoảng thời gian từ 6 đến 100 giờ.

Các dẫn xuất thioamit trong sơ đồ phản ứng (11) ở trên có thể được điều chế từ các dẫn xuất amit theo các quy trình lưu huỳnh hóa đã biết trong lĩnh vực (bước phản ứng B). Quy trình chuyển hóa này thường được thực hiện bằng cách xử lý các amit đã nêu bằng tác nhân lưu huỳnh hóa ví dụ, phospho pentasulfua hoặc 2,4-bis-(4-metoxi-phenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan 2,4-disulfua [chất phản ứng Lawesson], trong các điều kiện không có dung môi hoặc trong dung môi không phản ứng ví dụ, tetrahydrofuran hoặc 1,4-dioxan và dung môi tương tự, tùy ý với sự có mặt của bazơ thích hợp như pyridin trong các điều kiện gia nhiệt ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ từ 50 đến 100°C, ví dụ trong 24 giờ.

Các dẫn xuất amin có công thức (IX-a) và (IX-c) trong sơ đồ phản ứng (11) ở trên có thể được điều chế từ các hợp chất trung gian tương ứng có công thức (XII-a) và (XII-c) theo các quy trình đóng vòng đã biết trong lĩnh vực (bước phản ứng C). Phản ứng đóng vòng này thường có thể được thực hiện bằng cách xử lý các hợp chất trung gian có công thức (XII-a) và (XII-c) bằng bazơ thích hợp, như kali axetat, trong dung môi phản ứng thích hợp, chẳng hạn như etanol và các dung môi tương tự, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 100°C, trong khoảng thời gian đảm bảo hoàn thành phản ứng.

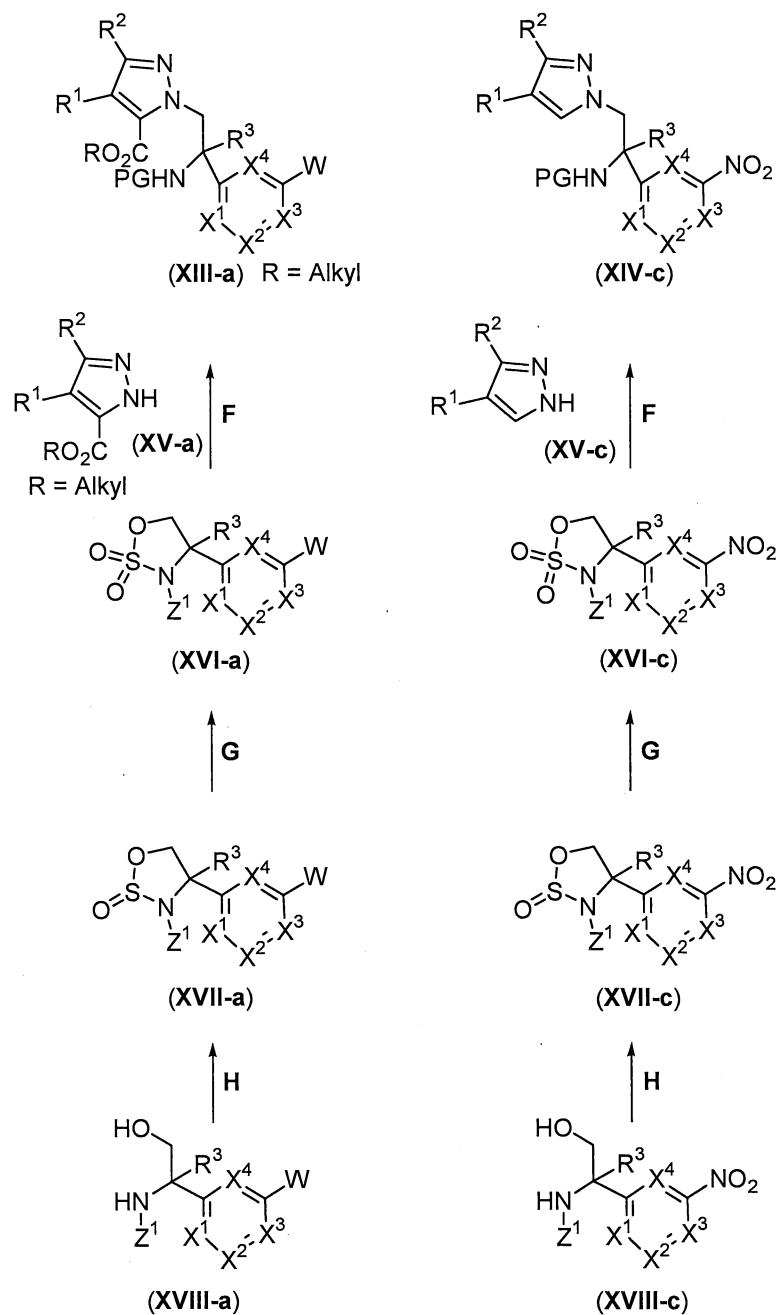
Các hợp chất trung gian có công thức (IX-a), trong đó R^2 là hydro, có thể được điều chế từ hợp chất trung gian có công thức (IX-a-1), trong đó R^2 là nitro, bằng cách khử nhóm nitro thành amino, tiếp theo là phản ứng diazo hóa-loại nhóm amin hóa.

Các hợp chất trung gian có công thức (IX-a), trong đó R^2 là diflometyl, có thể được điều chế từ hợp chất trung gian có công thức (IX-a-2), trong đó R^2 là alkoxycarbonyl, bằng cách chuyển hóa nhóm este thành aldehyt theo một trong số các

phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, tiếp theo là phản ứng của nhóm aldehyt với DAST.

Các hợp chất trung gian có công thức (XII-a) và (XII-c) trong sơ đồ phản ứng (11) ở trên có thể được điều chế từ các hợp chất trung gian có công thức (XIII-a) và (XIII-c) tương ứng bằng cách tiến hành loại bỏ nhóm bảo vệ theo các quy trình đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ (bước phản ứng D).

Các hợp chất trung gian có công thức (XIII-c) trong sơ đồ phản ứng (11) ở trên có thể được điều chế từ các hợp chất trung gian tương ứng có công thức (XIV-c) theo quy trình thế nguyên tử hydro bằng kim loại đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ (bước phản ứng E). Việc thế nguyên tử hydro bằng kim loại đã nêu thường có thể được thực hiện bằng cách xử lý các hợp chất trung gian có công thức (XIV-c) bằng bazơ thích hợp, như lithi diisopropylamit, và chất ái nhân thích hợp như đá khô hoặc etyl clorofomat, trong dung môi phản ứng thích hợp, chẳng hạn tetrahydrofuran, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -80°C đến 0°C , trong khoảng thời gian đảm bảo hoàn thành phản ứng.



Sơ đồ phản ứng 12

F: Alkyl hóa

G: Oxy hóa oxathiazolidin

H: Tạo thành oxathiazolidin

Các hợp chất trung gian có công thức (XIII-a) và (XIV-c) trong sơ đồ phản ứng (12) ở trên có thể được điều chế từ các hợp chất trung gian có công thức (XVI-a) và (XVI-c) tương ứng, trong đó Z^1 là nhóm bảo vệ các amin ví dụ, nhóm *tert*-

butoxycarbonyl, theo các quy trình alkyl hóa đã biết trong lĩnh vực (bước phản ứng F). Alkyl hóa đã nêu thường có thể được thực hiện bằng cách xử lý các hợp chất có công thức (XV-a) và (XV-c) lần lượt bằng các hợp chất trung gian tương ứng có công thức (XVI-a) và (XVI-c) với bazơ thích hợp ví dụ, natri carbonat hoặc xesi carbonat, trong dung môi không phản ứng thích hợp ví dụ, *N,N*-dimetyl formamit hoặc dimetoxysulfoxit, ở nhiệt độ thấp ví dụ, 0°C trong 30 phút và sau đó ở nhiệt độ cao vừa phải ví dụ, 100°C trong 24 giờ đến 100 giờ hoặc ví dụ, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 130°C, ví dụ trong 30 phút đến 45 phút trong điều kiện chiếu vi sóng.

Các hợp chất trung gian có công thức (XVI-a) và (XVI-c) trong sơ đồ phản ứng (12) trên có thể được điều chế bằng phản ứng giữa các hợp chất trung gian có công thức (XVII-a) và (XVII-c) theo quy trình oxy hóa đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này (bước phản ứng G). Phản ứng oxy hóa này thường có thể được thực hiện bằng cách xử lý các hợp chất trung gian tương ứng có công thức (XVII-a) và (XVII-c) bằng tác nhân oxy hóa ví dụ, natri periodat trong dung môi không phản ứng thích hợp ví dụ, axetonitril/nước, với sự có mặt của ruteni (III) clorua ở nhiệt độ cao vừa phải ví dụ, 25°C, ví dụ trong 2 giờ.

Các hợp chất trung gian có công thức (XVII-a) và (XVII-c) trong sơ đồ phản ứng (12) ở trên có thể được điều chế bằng phản ứng giữa các hợp chất trung gian có công thức (XVIII-a) và (XVIII-c) theo các quy trình tạo ra sulfamidat đã biết trong lĩnh vực (bước phản ứng H). Phản ứng chuyển hóa đã nêu thường có thể được thực hiện bằng cách xử lý các hợp chất trung gian có công thức (XVIII-a) và (XVIII-c) tương ứng bằng thionyl clorua, với sự có mặt của bazơ ví dụ, pyridin, trong dung môi không phản ứng thích hợp, ví dụ, axetonitril, ở nhiệt độ thấp ví dụ, -40°C, ví dụ trong 30 phút và sau đó ở nhiệt độ cao vừa phải ví dụ, 25°C, ví dụ trong 24 đến 72 giờ.

Các hợp chất trung gian có công thức (XVIII-a) và (XVIII-c), trong đó Z^1 là nhóm bảo vệ amin ví dụ, nhóm *tert*-butoxycarbonyl, thường có thể được điều chế theo các quy trình Strecker đã biết trong lĩnh vực được mô tả trong tài liệu chuyên ngành.

Dược lý

Các hợp chất của sáng chế và các chế phẩm dược dụng của nó ức chế BACE và do đó có thể hữu ích trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh Alzheimer (AD), bệnh suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), tình trạng lão suy, sa sút trí tuệ, sa sút trí tuệ đi kèm với thể

Lewy, bệnh mạch máu não dạng amyloid, sa sút trí tuệ do nhồi máu nhiều lần, hội chứng Down, sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson và sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid.

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức chung (I), dạng đồng phân lập thể của nó hoặc muối cộng axit hoặc bazơ được dùng hoặc solvat của nó, để dùng làm thuốc.

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất có công thức chung (I), dạng đồng phân lập thể của nó hoặc muối cộng axit hoặc bazơ được dùng hoặc solvat của nó, để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh được chọn từ nhóm bao gồm AD, MCI, tình trạng lão suy, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với thể Lewy, bệnh mạch máu não dạng amyloid, sa sút trí tuệ do nhồi máu nhiều lần, hội chứng Down, sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson và sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức chung (I), dạng đồng phân lập thể của nó hoặc muối cộng axit hoặc bazơ được dùng hoặc solvat của nó, để bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa các tình trạng bệnh bất kỳ trong số các tình trạng bệnh nêu trên.

Xét về tính hữu ích của hợp chất có công thức (I), sáng chế mô tả phương pháp điều trị động vật máu nóng, bao gồm người, mắc bệnh hoặc mô tả phương pháp ngăn ngừa động vật máu nóng, bao gồm người, mắc bất kỳ một trong số các bệnh nêu trên.

Các phương pháp đã nêu bao gồm việc cho dùng, tức là sử dụng toàn thân hoặc khu trú, tốt hơn là sử dụng qua đường miệng, một lượng có tác dụng điều trị của hợp chất có công thức (I), dạng đồng phân lập thể của nó, muối cộng được dùng hoặc solvat của nó, cho động vật máu nóng, kể cả người.

Phương pháp điều trị này cũng có thể bao gồm việc cho dùng thành phần hoạt tính theo chế độ từ một đến bốn lần một ngày. Trong các phương pháp này, các hợp chất theo sáng chế tốt hơn là được phối chế trước khi sử dụng. Như được mô tả trong bản mô tả dưới đây, các chế phẩm thuốc thích hợp được bào chế theo các quy trình đã biết bằng cách sử dụng các thành phần sẵn có và đã biết.

Các hợp chất của sáng chế, mà có thể thích hợp để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer hoặc các triệu chứng của nó, có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác. Việc điều trị kết hợp bao gồm việc cho dùng

một dược phẩm duy nhất mà chứa hợp chất có công thức (I) và một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác, cũng như việc cho dùng hợp chất có công thức (I) và từng chất trị liệu bổ sung khác trong từng dược phẩm chứa từng chất này. Ví dụ, hợp chất có công thức (I) và chất trị liệu có thể được sử dụng cho bệnh nhân cùng nhau trong một chế phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng như viên nén hoặc viên nang, hoặc từng chất trị liệu có thể được dùng dưới dạng các chế phẩm dùng qua đường miệng riêng lẻ.

DƯỢC PHẨM

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh trong đó việc ức chế beta-secretaza đem lại lợi ích, như bệnh Alzheimer (AD), bệnh suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh lão suy, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với đột quỵ, bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với bệnh Parkinson và bệnh sa sút trí tuệ đi kèm với dạng beta-amyloid. Chế phẩm này bao gồm lượng có tác dụng điều trị của hợp chất có công thức (I) và chất mang hoặc chất pha loãng được dùng.

Các hoạt chất, tốt hơn là có thể được dùng một mình nhưng trình bày nó dưới dạng dược phẩm. Do vậy, sáng chế còn đề xuất dược phẩm bao gồm hợp chất của sáng chế, cùng với chất mang hoặc chất pha loãng được dùng. Chất mang hoặc chất pha loãng cần phải “chấp nhận được” theo nghĩa có thể tương thích với các thành phần khác của dược phẩm và không gây hại cho người nhận nó.

Dược phẩm của sáng chế có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã được biết rõ trong lĩnh vực dược phẩm. Lượng có tác dụng điều trị của hợp chất cụ thể, dưới dạng bazơ hoặc dạng muối cộng, làm thành phần hoạt tính được kết hợp với hỗn hợp trộn kỹ với chất mang được dùng, có thể có nhiều dạng khác nhau tùy thuộc vào dạng bào chế mong muốn để dùng. Các dược phẩm này được mong muốn ở dạng liều đơn vị phù hợp, tốt hơn là, để dùng toàn thân như dùng qua đường miệng, dưới da hoặc ngoài đường tiêu hóa; hoặc dùng khu trú như bằng cách xông hít, xịt vào mũi, nhỏ mắt hoặc dưới hình thức kem bôi, gel, dầu gội đầu hoặc các dạng tương tự. Ví dụ, để bào chế dược phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, môi trường được dùng bất kỳ trong số các môi trường được dùng thông thường có thể được sử dụng, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và các môi trường tương tự trong trường hợp chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như huyền phù, si rô, cồn ngọt và dung dịch; hoặc chất mang rắn như dạng amyloid, đường, cao lạnh, chất bôi trơn, chất kết dính, chất gây rã và các chất tương tự trong trường hợp thuốc bột, viên tròn,

viên nang và viên nén. Do tính dễ sử dụng, viên nén và viên nang là dạng liều đơn vị dùng qua đường miệng thuận tiện nhất, trong trường hợp đó chất mang rắn được dùng hiển nhiên là được sử dụng. Đối với dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, chất mang thường sẽ bao gồm nước vô trùng, ít nhất với lượng lớn, ngoài các thành phần khác, ví dụ, để hỗ trợ việc hòa tan, có thể được bao gồm. Dung dịch tiêm, ví dụ, có thể được bào chế trong đó chất mang bao gồm dung dịch nước muối, dung dịch glucoza hoặc hỗn hợp dung dịch nước muối và glucoza. Huyền phù dùng để tiêm cũng có thể được bào chế trong trường hợp này chất mang lỏng thích hợp, tác nhân tạo huyền phù và các chất tương tự có thể được sử dụng. Trong các dược phẩm thích hợp để dùng dưới da, chất mang tùy ý bao gồm chất làm tăng cường độ thấm qua và/hoặc tác nhân có thể làm ẩm thích hợp, tùy ý được kết hợp với chất phụ gia thích hợp có bản chất bất kỳ với tỷ lệ nhỏ, mà các chất phụ gia này không gây ra tác dụng có hại bất kỳ đáng kể nào cho da. Các chất phụ gia này có thể hỗ trợ việc sử dụng cho da và/hoặc có thể giúp ích cho việc bào chế các dược phẩm mong muốn. Các dược phẩm này có thể được sử dụng theo các cách khác nhau, ví dụ, dưới dạng miếng đắp qua da, dưới dạng thuốc chấm hoặc dưới dạng thuốc mỡ.

Đặc biệt thuận tiện nếu bào chế dược phẩm nêu trên dưới dạng liều đơn vị để dễ sử dụng và tạo ra các liều đồng đều. Dạng liều đơn vị được sử dụng trong phần mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ ở đây dùng để chỉ đơn vị rời rạc về mặt lý thích hợp làm liều đơn vị, mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính toán để tạo ra hiệu quả trị liệu mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết. Các ví dụ về các dạng liều đơn vị này là viên nén (bao gồm viên nén có khía hoặc được bao), viên nang, viên tròn, gói thuốc bột, mảng cấy, dung dịch tiêm hoặc huyền phù, thìa cà phê, thìa súp và các loại tương tự, và các dạng đa liều riêng rẽ của chúng.

Liều dùng chính xác và số lần dùng tùy thuộc vào hợp chất công thức (I) cụ thể được dùng, tình trạng bệnh cụ thể được điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh đang được điều trị, độ tuổi, cân nặng, giới tính, mức độ trầm trọng của rối loạn và tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà bệnh nhân đang dùng, như được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Hơn nữa, rõ ràng là lượng hữu hiệu dùng hàng ngày nêu trên có thể giảm xuống hoặc tăng lên tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào sự đánh giá của bác sĩ chỉ định dùng các hợp chất của sáng chế.

Tùy thuộc vào đường dùng, dược phẩm sẽ bao gồm từ 0,05 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 70% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 50% khối lượng hoạt chất, và, từ 1 đến 99,95% khối lượng, tốt hơn là từ 30 đến 99,9% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 50 đến 99,9% khối lượng chất mang dược dụng, tất cả tỷ lệ phần trăm tính theo tổng khối lượng của dược phẩm.

Các hợp chất của sáng chế có thể được dùng theo đường toàn thân như dùng qua đường miệng, dưới da hoặc ngoài đường tiêu hóa; hoặc dùng khu trú như bằng cách xông hít, xịt vào mũi, nhỏ mắt hoặc thoa kem, gel, dầu gội đầu hoặc các đường dùng khác. Các hợp chất này tốt hơn là được dùng qua đường miệng. Liều lượng chính xác và số lần dùng tùy thuộc vào hợp chất cụ thể có công thức (I) được sử dụng, tình trạng bệnh cụ thể được điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh đang được điều trị, độ tuổi, cân nặng, giới tính, mức độ trầm trọng của rối loạn và tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân cụ thể cũng như thuốc khác mà bệnh nhân đang dùng, như được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Hơn nữa, rõ ràng là lượng dùng hàng ngày hữu hiệu đã nêu có thể giảm xuống hoặc tăng lên tùy thuộc vào đáp ứng của đối tượng được điều trị và/hoặc tùy thuộc vào sự đánh giá của bác sĩ chỉ định dùng các hợp chất của sáng chế.

Lượng hợp chất có công thức (I) có thể được kết hợp với chất mang tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi tùy thuộc vào bệnh được điều trị, các loài động vật có vú, và đường dùng cụ thể. Tuy nhiên, theo hướng dẫn chung, các liều đơn vị thích hợp cho các hợp chất của sáng chế có thể, ví dụ, tốt hơn là chứa từ 0,1mg đến 1000mg hoạt chất. Liều đơn vị được ưu tiên nằm trong khoảng từ 1mg đến 500mg. Liều đơn vị được ưu tiên hơn là nằm trong khoảng từ 1mg đến 300mg. Một liều đơn vị được ưu tiên hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1mg đến 100mg. Các liều đơn vị này có thể được dùng nhiều hơn một lần trong ngày, ví dụ, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 lần trong ngày, nhưng tốt hơn là 1 hoặc 2 lần trong ngày, sao cho tổng liều cho người lớn có cân nặng 70 kg nằm trong khoảng từ 0,001 đến 15mg tính theo kg cân nặng của đối tượng sử dụng. Liều lượng được ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,5mg cho mỗi kg cân nặng của đối tượng sử dụng, và thời gian điều trị này có thể kéo dài vài tuần hoặc vài tháng, và trong một số trường hợp, vài năm. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, mức liều lượng cụ thể cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ sẽ tùy thuộc vào hoạt tính của hợp chất cụ thể được sử dụng; độ tuổi, cân nặng, sức khỏe tổng quát, giới tính và chế độ ăn của từng bệnh nhân được điều trị; thời gian và đường dùng; tốc độ bài

tiết; các thuốc khác đã được dùng trước đó; và mức độ nghiêm trọng của bệnh cụ thể đang điều trị, như được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Trong một số trường hợp, có thể cần phải sử dụng liều lượng nằm ngoài khoảng này như đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến. Ngoài ra, lưu ý rằng bác sĩ lâm sàng hoặc bác sĩ điều trị sẽ biết cách thức hoặc thời điểm bắt đầu, ngừng, điều chỉnh hoặc kết thúc việc điều trị dựa vào đáp ứng ứng của từng bệnh nhân.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được dự định để minh họa chứ không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Phần thử nghiệm

Sau đây, thuật ngữ “AcOH” có nghĩa là axit axetic, “HCl” có nghĩa là axit clohydric, “AcOEt” có nghĩa là etylaxetat, “DCM” có nghĩa là diclometan, “DIPE” có nghĩa là diisopropylete, “DMF” có nghĩa là *N,N*-dimetylformamit, “CO₂” có nghĩa là cacbon dioxit, “DMSO” có nghĩa là dimetylsulfoxit, “Et₂O” có nghĩa là dietylete, “Et₃N” có nghĩa là trietylamin, “EtOH” có nghĩa là etanol, “iPrOH” có nghĩa là isopropanol, “iPrNH₂” có nghĩa là isopropylamin, “MeCN” có nghĩa là axetonitril, “MeOH” có nghĩa là metanol, “NaOH” có nghĩa là natri hydroxit, “NH₄Cl” có nghĩa là amoni clorua, “NH₃” có nghĩa là amoniac, “NaHCO₃” có nghĩa là natri bicarbonat, “NaHSO₄” có nghĩa là natri hydrosulfat, “Na₂CO₃” có nghĩa là natri carbonat, “Na₂SO₄” có nghĩa là natri sulphat, “H₂SO₄” có nghĩa là axit sulphuric, “MgSO₄” có nghĩa là magie sulphat, “CuI” có nghĩa là đồng iodua, “TFA” có nghĩa là axit triflometansulfonic, “RuO₂” có nghĩa là ruteni oxit, “DAST” có nghĩa là dietylaminolưu huỳnh triflorua, “DBU” có nghĩa là 1,8-diazabixyclo[5.4.0]undec-7-en, “N₂” có nghĩa là nitơ, “CO₂” có nghĩa là cacbon dioxit, “aq.” có nghĩa là chứa nước, “min” có nghĩa là phút, “m.p.” có nghĩa là điểm nóng chảy, “rac” có nghĩa là raxemic, “R_t” có nghĩa là thời gian lưu, “THF” có nghĩa là tetrahydrofuran, “SFC” có nghĩa là chạy sắc ký lỏng siêu tới hạn.

Phản ứng được trợ giúp bằng vi sóng được thực hiện trong bình phản ứng một chế độ: Bình phản ứng vi sóng EmrysTM Optimizer (Personal Chemistry A.B., hiện là Biotage).

Các phản ứng hydro hóa được thực hiện trong thiết bị hydro hóa dòng liên tục H-CUBE® từ nhà sản xuất ThalesNano Nanotechnology Inc.

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên các đĩa silicagel 60 F254 (Merck) có sử dụng dung môi loại dùng làm chất phản ứng. Thực hiện sắc ký trên cột hở nhồi silicagel, cỡ hạt 60 Å, cỡ sàng = 230-400 (Merck) trong các kỹ thuật chuẩn. Sắc ký cột nhanh được thực hiện bằng cách sử dụng cột đã được nối sẵn từ nhà sản xuất Merck, trên silicagel không đồng đều, cỡ hạt 15-40µm (cột sắc ký nhanh dùng một lần lớp thông thường) trên hệ thống SPOT hoặc LAFLASH từ Armen Instrument.

Độ quay quang được xác định trên phân cực kế Perkin-Elmer 341 với đèn natri và được thể hiện như sau: $[\alpha]^\circ$ (λ , c g/100ml, dung môi, T°C).

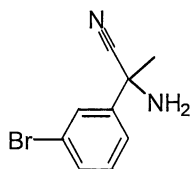
Các phản ứng dòng được thực hiện trong thiết bị môđun Vapourtec R2+R4 có bán trên thị trường.

Đối với các hợp chất trung gian quan trọng, cũng như một số hợp chất cuối cùng, cấu hình tuyệt đối của các tâm không đối xứng (được chỉ ra dưới dạng *R* và/hoặc *S*) được thiết lập thông qua việc so sánh với các mẫu có cấu hình đã biết, hoặc sử dụng các kỹ thuật phân tích thích hợp để xác định cấu hình tuyệt đối, như VCD (máy quang phổ lưỡng sắc tròn dao động-vibrational circular dichroism) hoặc phép xác định tinh thể bằng tia X. Khi cấu hình tuyệt đối ở tâm không đối xứng chưa được biết đến, nó được ký hiệu một cách tùy ý là *R**.

A. Điều chế các hợp chất trung gian

Ví dụ A1

Điều chế hợp chất trung gian A1: rac-2-amino-2-(3-bromo-phenyl)-propionitril

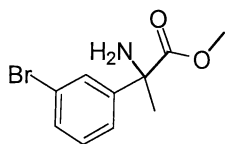


Bổ sung trimethylsilylxyanua (20 g, 200 mmol) vào dung dịch đã khuấy chứa 3-bromo-axetophenon (20 g, 100 mmol) và NH₄Cl (11 g, 200 mmol) trong NH₃/MeOH (400 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Dung môi được làm bay hơi trong chân không và phần cặn được hấp thụ trong AcOEt (100 mL). Chất rắn

được lọc ra và phần dịch lọc được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A1 (20 g, hiệu suất 86%), chất này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Ví dụ A2

Điều chế hợp chất trung gian A2: Metyl este của axit rac-2-amino-2-(3-bromophenyl)-propionic

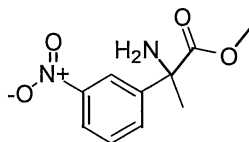


Hợp chất trung gian A1 (20 g, 88,9 mmol) được hòa tan trong HCl/MeOH (500 mL). Hỗn hợp này được đun hồi lưu trong 4 ngày. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, bổ sung AcOEt (100 mL) và H₂O (100 mL) và chiết hỗn hợp này bằng AcOEt (2 x 100 mL). Lớp nước gom lại được bazơ hóa bằng dung dịch NH₃ đến độ pH = 8 và được chiết bằng AcOEt (5 x 100 mL). Các lớp chất hữu cơ gom lại được làm khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A2 (10,6 g, hiệu suất 46%) dưới dạng dầu. LCMS: 258 [M+H]⁺; R_t: 3,77 phút (phương pháp 7).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A1 - A2:

Ví dụ A3

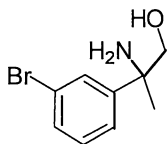
Điều chế hợp chất trung gian A3: Metyl este của axit rac-2-amino-2-(3-nitrophenyl)-propionic



Từ rac-2-amino-2-(3-nitrophenyl)-propionitril. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/ete dầu mỏ) thu được hợp chất trung gian 3 (63%). LCMS: 225 [M+H]⁺; R_t: 0,98 phút (phương pháp 9).

Ví dụ A4

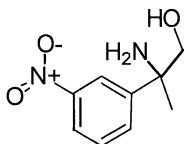
Điều chế hợp chất trung gian A4: rac-2-amino-2-(3-bromo-phenyl)-propan-1-ol



Bổ sung từng giọt lithi nhôm hydrua (1 M trong THF; 22 mL, 22 mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian A2 (7,5 g, 29,1 mmol) trong THF (200 mL) ở nhiệt độ -15°C . Hỗn hợp này được để ấm dần đến nhiệt độ 0°C trong 1 giờ. Bổ sung thêm THF (150 mL) và bổ sung từng giọt dung dịch Na_2SO_4 bão hòa cho đến khi không còn hydro tạo thành. Bổ sung Na_2SO_4 khan và khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Lọc hỗn hợp trên đất diatomit, rửa bằng THF và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không thu được hợp chất trung gian A4 (5,70 g, hiệu suất 85%) dưới dạng dầu. LCMS: 230 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 0,69 phút (phương pháp 1).

Ví dụ A5

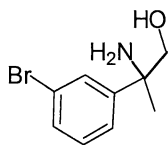
Điều chế hợp chất trung gian A5: rac-2-amino-2-(3-nitro-phenyl)-propan-1-ol



Bổ sung từng phần natri bohydrua (16,3 g, 429,4 mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian A3 (48,3 g, 214,7 mmol) trong MeOH (500 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 10 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Bazo hóa phần cặn bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa đến độ pH = 9 và được chiết bằng AcOEt (3 x 200 mL). Làm khô lớp chất hữu cơ (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A5 (30,26 g, hiệu suất 72%). LCMS: 197 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 3,16 phút (phương pháp 8); điểm nóng chảy $238,7\text{-}241,6^{\circ}\text{C}$ (WRS-2A).

Ví dụ A6

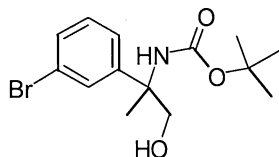
Điều chế hợp chất trung gian A6: (*R*)-2-amino-2-(3-bromo-phenyl)-propan-1-ol



Một mẫu của hợp chất trung gian A4 (15,4 g) được tách thành các chất đồng phân đối ảnh tương ứng bằng SFC điều chế (Chiralpak® Daicel AD x 250 mm). Pha động (CO₂, MeOH với iPrNH₂ 0,2%) thu được hợp chất trung gian A6 (7,21 g, hiệu suất 40%). LCMS: 230 [M+H]⁺; R_t: 0,71 phút (phương pháp 1); α_D: -14,9° (589 nm, c 0,2946% khối lượng/thể tích, MeOH, 20°C).

Ví dụ A7

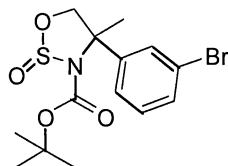
Điều chế hợp chất trung gian A7: tert butyl este của axit (*R*)-[1-(3-bromo-phenyl)-2-hydroxy-1-metyl-etyl]-carbamic



Bổ sung từng phần di-*tert*-butyldicarbonat (19,8 g, 90,7 mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian A6 (11,6 g, 50,4 mmol) trong hỗn hợp gồm dung dịch NaHCO₃ bão hòa (100 mL) và THF (100 mL) ở nhiệt độ 0°C. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 0°C trong 10 phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 15 giờ. Hỗn hợp này được làm lạnh trong bể nước đá/H₂O và được axit hóa kết hợp khuấy đến độ pH = 1-2 bằng NaHSO₄. Lớp chất hữu cơ được tách ra và lớp nước được chiết thêm bằng AcOEt. Các lớp chất hữu cơ được gom lại được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột ngắn (silica gel; AcOEt/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A7 (16,47 g, hiệu suất 99%) dưới dạng dầu không màu, dầu này được hóa rắn khi để yên. LCMS: 330 [M+H]⁺; R_t: 2,58 phút (phương pháp 1).

Ví dụ A8

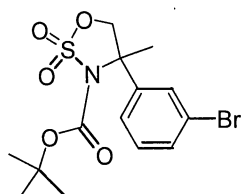
Điều chế hợp chất trung gian A8: (*R*)-[3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-4-(3-bromo-phenyl)-4-metyl-1,1,3]oxathiazolidin-2-oxit



Bổ sung từng giọt dung dịch chứa hợp chất trung gian A7 (14,3 g, 43,3 mmol) trong MeCN khan (80 mL) vào dung dịch đang khuấy chứa thionyl clorua (7,9 mL, 108,3 mmol) trong MeCN khan (226 mL) đã được làm lạnh xuống -40°C và trong môi trường N_2 . Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 30 phút ở -40°C trước khi bổ sung pyridin (17,4 mL, 216,5 mmol). Hỗn hợp phản ứng được để ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 64 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được xử lý bằng Et_2O . Các chất rắn được lọc và phần dịch lọc được cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A8 (15,5 g, hiệu suất 95%) dưới dạng dầu màu đỏ. Sản phẩm này được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS: 393 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; R_t : 3,4 phút (phương pháp 1).

Ví dụ A9

Điều chế hợp chất trung gian A9: (*R*)-[3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-4-(3-bromophenyl)-4-metyl-1,1,3]oxathiazolidin-2,2-dioxit



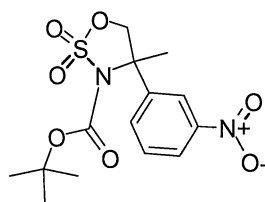
Bổ sung ruteni (III) clorua (85 mg, 0,41 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A8 (15,3 g, 40,8 mmol) trong hỗn hợp gồm MeCN và H_2O (1:1) (438 mL) ở nhiệt độ 0°C , tiếp theo là bổ sung natri periodat (13,1 g, 61,2 mmol) vào. Hỗn hợp phản ứng được để ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 2 giờ. Lọc hỗn hợp này qua đất diatomit và rửa bằng AcOEt (125 mL). Bổ sung H_2O (125 mL) và AcOEt (250 mL) vào phần dịch lọc. Lọc chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A9 (14,4 g, hiệu suất 90%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

LCMS: 409 $[M+NH_4]^+$; R_t : 3,3 phút (phương pháp 1); điểm nóng chảy 133,1°C (FP90); α_D : -35,6° (589 nm, đặc. 0,55% khối lượng/thể tích, DMF, 20°C).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A7 - A9:

Ví dụ A10

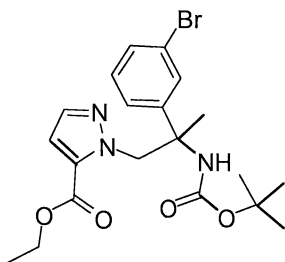
Điều chế hợp chất trung gian A10: rac-[3-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-(3-nitro-phenyl)-4-methyl-[1,1,3]oxathiazolidin-2,2-dioxit



Được điều chế từ rac-[3-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-(3-nitro-phenyl)-4-methyl-[1,1,3]oxathiazolidin-2-oxit. Sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM) thu được hợp chất trung gian A10 dưới dạng chất rắn màu vàng (95%). LCMS: 376 $[M+NH_4]^+$; R_t : 1,35 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A11

Điều chế hợp chất trung gian A11: Etyl este của axit 2-[2-(3-bromo-phenyl)-2*R*-*tert*-butoxycarbonyl-amino-propyl]-2*H*-pyrazol-3-carboxylic

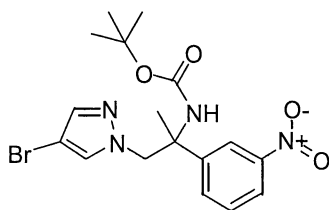


Bổ sung xesi carbonat (824 mg, 2,53 mmol) vào hỗn hợp gồm hợp chất trung gian A9 (0,661 g, 1,69 mmol) và etyl este của axit 2*H*-pyrazol-3-carboxylic (260 mg, 1,86 mmol) trong DMSO (8 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và ở nhiệt độ 110°C trong 3 giờ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch axit xitric bão hòa và DCM (20 mL) và được khuấy trong 2 giờ. Pha hữu cơ

được tách ra và được xử lý bằng H₂O (10 mL) và được chiết bằng DCM (2 x 10 mL). Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A11 (186 mg, hiệu suất 24%) dưới dạng dầu không màu. LCMS: 452 [M+H]⁺; R_t: 4,23 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A12

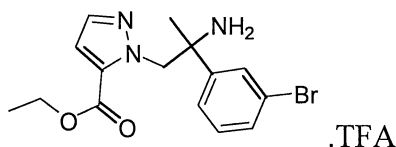
Điều chế hợp chất trung gian A12: tert-butyl este của axit rac-[2-(4-bromopyrazol-1-yl)-1-metyl-1-(3-nitro-phenyl)-etyl]-carbamic



Bổ sung natri carbonat (59 mg, 0,56 mmol) vào hỗn hợp gồm hợp chất trung gian A10 (100 mg, 0,28 mmol) và 4-bromo-1H-pyrazol (53 mg, 0,36 mmol) trong DMF (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 130°C trong 2 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được xử lý bằng H₂O (2 mL) và được chiết bằng DCM (2 x 10 mL). Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A12 (100 mg, hiệu suất 84%) dưới dạng chất rắn màu trắng sau khi xử lý bằng Et₂O lạnh. LCMS: 425 [M+H]⁺; R_t: 3,57 phút (phương pháp 3); điểm nóng chảy 159,3°C (FP 90).

Ví dụ A13

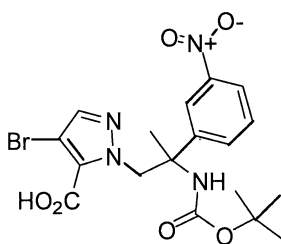
Điều chế hợp chất trung gian A13: Ethyl este của axit (R)-2-[2-amino-2-(3-bromophenyl)propyl]-2H-pyrazol-3-carboxylic



Bổ sung axit trifloaxetic (1 mL) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian A11 (186 mg, 0,41 mmol) trong DCM (5 mL) ở nhiệt độ 0°C. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A13 (180 mg, hiệu suất 94%) dưới dạng dầu không màu, chất này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS: 352 $[M+H]^+$; R_t : 2,69 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A14

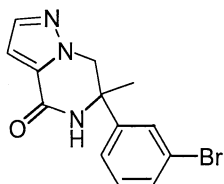
Điều chế hợp chất trung gian A14: Axit rac-4-bromo-2-[2-*tert*-butoxycarbonylamino-2-(3-nitro-phenyl)-propyl]-2*H*-pyrazol-3-carboxylic



Bổ sung dung dịch lithi diisopropylamit 2M trong THF và heptan (0,25 mL, 0,49 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A12 (100 mg, 0,24 mmol) trong THF (3 mL) ở nhiệt độ -78°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ -78°C trong 1 giờ. Sau đó bổ sung đá khô và để ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ trong phòng trong hơn 2 giờ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa và được chiết bằng DCM (3 x 10 mL). Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô, lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A14 (60 mg, hiệu suất 54%) dưới dạng dầu không màu. LCMS: 469 $[M+H]^+$; R_t : 1,74 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A15

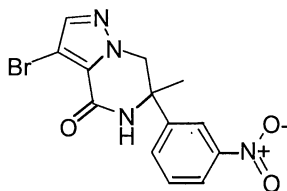
Điều chế hợp chất trung gian A15: (*R*)-6-(3-bromo-phenyl)-6-metyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4-on



Bổ sung kali axetat (83 mg, 0,85 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A13 (180 mg, 0,39 mmol) trong EtOH (5 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 90°C trong 5 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được xử lý bằng dung dịch nước HCl 0,5 M và được chiết bằng DCM. Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A15 (100 mg, hiệu suất 84%) dưới dạng dầu không màu. LCMS: 306 [M+H]⁺; R_t: 2,01 phút (phương pháp 4).

Ví dụ A16

Điều chế hợp chất trung gian A16: rac-3-bromo-6-metyl-6-(3-nitro-phenyl)-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on



Phương pháp A

Bổ sung axit trifloaxetic (3 mL) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A14 (200 mg, 0,4 mmol) trong DCM (20 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau đó bổ sung kali axetat (59 mg, 0,06 mmol) trong EtOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 90°C trong 3 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần thô được xử lý bằng dung dịch nước HCl 1M (10 mL) và sản phẩm này được chiết bằng AcOEt (4 x 20 mL). Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A16 (120 mg, hiệu suất 19%) dưới dạng chất

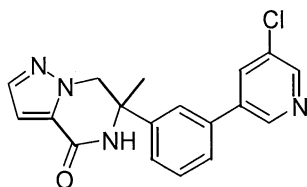
rắn màu trắng. LCMS: 351 $[M+H]^+$; R_t : 2,45 phút (phương pháp 5); điểm nóng chảy 285,3°C (FP 90).

Phương pháp B

Bổ sung axit trifloaxetic (100 mL) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian A23 (6,5 g, 13,07 mmol) trong DCM (200 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không, sau đó bổ sung kali axetat (1,924 g, 19,60 mmol) và EtOH (100 mL), và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ hồi lưu trong 4 giờ. Hỗn hợp thô được làm bay hơi trong chân không và phần cặn được xử lý bằng dung dịch nước HCl 1M đến độ pH = 3. Sản phẩm thô này được chiết bằng AcOEt (3 x 50 ml), pha hữu cơ được làm bay hơi đến khô và sản phẩm thô được xử lý bằng EtOH lạnh và Et₂O để thu được hợp chất trung gian A16 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Dung môi được thu gom được làm bay hơi trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không để thu được mẻ khác của hợp chất trung gian A16 dưới dạng chất rắn màu trắng (lượng được thu gom 4 g, 87%). LCMS: 351 $[M+H]^+$; R_t : 1,65 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A17

Điều chế hợp chất trung gian A17: (*R*)-6-[3-(5-clo-pyridin-3-yl)-phenyl]-6-methyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4-on

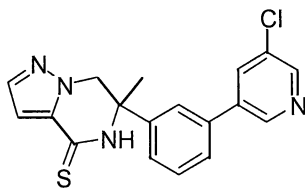


Bổ sung tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) (34 mg, 0,029 mmol) vào huyền phù đang khuấy gồm hợp chất trung gian A15 (90 mg, 0,29 mmol) và axit 5-clopyridin-3-boronic (55 mg, 0,35 mmol) trong hỗn hợp gồm 1,4-dioxan (5 mL) và dung dịch Na₂CO₃ bão hòa (3 mL) ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường N₂. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 150°C trong 15 phút trong điều kiện chiếu vi sóng. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được pha loãng bằng H₂O và được chiết bằng DCM. Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không.

Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không và rửa bằng EtOH lạnh và Et₂O, thu được hợp chất trung gian A17 (81 mg, hiệu suất 81%) dưới dạng chất rắn màu trắng. LCMS: 339 [M+H]⁺; R_t: 0,89 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A18

Điều chế hợp chất trung gian A18: (*R*)-6-[3-(5-clo-pyridin-3-yl)-phenyl]-6-metyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4-thion

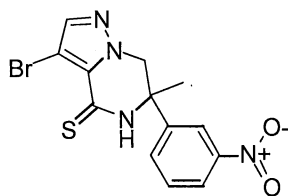


Bổ sung phosphopentasulfua (71 mg, 0,32 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A17 (90 mg, 0,27 mmol) trong pyridin (4 mL) và gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ 100°C trong 5 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột ngắn (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A18 (60 mg, hiệu suất 63%) dưới dạng dầu màu vàng. LCMS: 355 [M+H]⁺; R_t: 2,4 phút (phương pháp 3).

Các hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A18:

Ví dụ A19

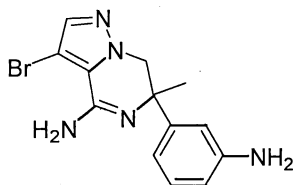
Điều chế hợp chất trung gian A19: rac-3-bromo-6-metyl-6-(3-nitro-phenyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4-thion



Được điều chế từ hợp chất trung gian A16. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A19 dưới dạng chất rắn màu vàng (87%). LCMS: 366 $[M+H]^+$; R_t : 2,37 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A20

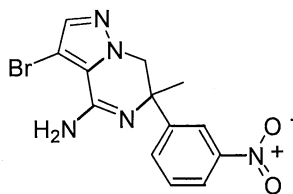
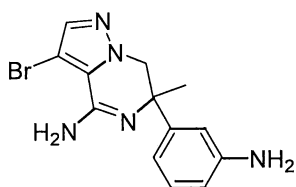
Điều chế hợp chất trung gian A20: rac-6-(3-amino-phenyl)-3-bromo-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



Bổ sung dung dịch nước NH_3 32% (3 mL) vào hỗn hợp đang khuấy gồm hợp chất trung gian A19 (600 mg, 1,63 mmol) trong dung dịch NH_3 7M trong MeOH (5 mL) trong bình kín. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ $60^\circ C$ trong 4 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, dung môi được làm bay hơi trong chân không. Hòa tan sản phẩm thô trong EtOH (20 mL) và bổ sung thiếc (II) clorua (372 mg, 1,96 mmol). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ $90^\circ C$ trong 24 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được lọc qua xelit và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được xử lý bằng dung dịch nước NaOH nồng độ 8% (10 mL) và được chiết bằng DCM (30 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A20 (200 mg, hiệu suất 38%) dưới dạng dầu màu vàng. LCMS: 320 $[M+H]^+$; R_t : 1,5 phút (phương pháp 6).

Ví dụ A21

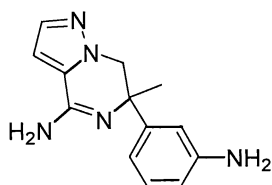
Điều chế hợp chất trung gian A20: rac-6-(3-amino-phenyl)-3-bromo-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin và hợp chất trung gian A21: rac-3-bromo-6-metyl-6-(3-nitro-phenyl)-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



Bổ sung dung dịch nước NH_3 32% (4 mL) vào hỗn hợp đang khuấy chứa hợp chất trung gian A19 (3,8 g, 10,35 mmol) trong dung dịch NH_3 7M trong MeOH (6 mL) trong bình kín. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 100°C trong 6 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, dung môi được làm bay hơi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không và tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian 20 (100 mg, hiệu suất 3%), hợp chất trung gian 21 (200 mg, hiệu suất 6%) và phân đoạn chứa hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 20 và 21 (2,5 g). LCMS: A20: 322 $[\text{M}+\text{H}]^+$, R_t : 0,87 phút (phương pháp 3); A21: 350 $[\text{M}+\text{H}]^+$, R_t : 0,95 phút (phương pháp 2)

Ví dụ A22

Điều chế hợp chất trung gian A22: rac-6-(3-amino-phenyl)-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



Phương pháp A

Dung dịch chứa hợp chất trung gian A20 (200 mg, 0,62 mmol) trong MeOH (30 mL) và Et_3N (5 mL) được hydro hóa trong bình phản ứng H-Cube (1,2 mL/phút, cột 30 mm paladi trên than 10%, chế độ hydro hoàn toàn, 50°C , 3 chu trình). Dung môi được cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian 22 (100 mg, hiệu suất 66%) dưới dạng chất rắn màu trắng. LCMS: 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$, R_t : 1,58 phút (phương pháp 3).

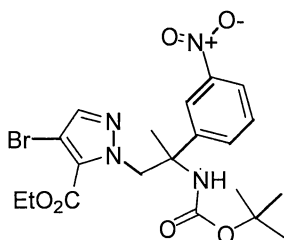
Phương pháp B

Bổ sung kẽm (1,33 g, 20,40 mmol) vào phân đoạn chứa hỗn hợp gồm các hợp chất trung gian 20 và 21 được mô tả trong ví dụ A21 (2,5 g, 7,46 mmol) trong EtOH (100 mL) và AcOH (20 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ hồi lưu trong 24 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được lọc qua xelit và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH₃ 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian 22 (0,93 g, hiệu suất 52%) dưới dạng dầu màu vàng, chất này kết tủa khi để yên.

Các hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A14, sử dụng ethyl cloroformat thay cho đá khô:

Ví dụ A23

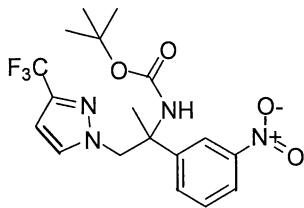
Điều chế hợp chất trung gian A23: Ethyl este của axit rac-4-bromo-2-[2-tert-butoxycarbonylamino-2-(3-nitrophenyl)-propyl]-2H-pyrazol-3-carboxylic



Được điều chế từ hợp chất trung gian A12. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan) thu được hợp chất trung gian A23 (65%). LCMS: 499 [M+H]⁺; R_t: 4,09 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A24

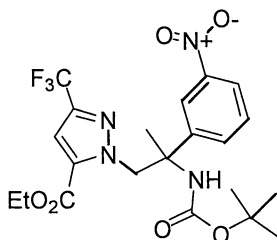
Điều chế hợp chất trung gian A24: tert-butyl este của axit rac-[1-metyl-1-(3-nitrophenyl)-2-(3-triflo-metylpyrazol-1-yl)-etyl]-carbamic



Bổ sung hợp chất trung gian A10 (2,5 g, 6,976 mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa 3-(triflo-metyl)pyrazol (1,234 g, 9,069 mmol) và kali carbonat (1,928 g, 13,952 mmol) trong DMF (175 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ 110°C trong 2 giờ. Dung môi được làm bay hơi và phần cặn được xử lý bằng dung dịch axit xitric bão hòa (80 mL) và AcOEt (160 mL). Hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô và làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và làm bay hơi trong chân không, thu được dầu trong suốt, mà dầu này sau khi xử lý bằng Et₂O lạnh và để yên, được kết tủa dưới dạng chất rắn màu trắng (2 g, 69%).

Ví dụ A25

Điều chế hợp chất trung gian A25: Etyl este của axit rac-2-[2-tert-butoxycarbonylamino-2-(3-nitro-phenyl)-propyl]-5-triflometyl-2H-pyrazol-3-carboxylic

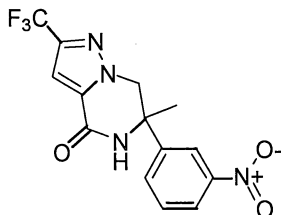


Được điều chế từ hợp chất trung gian A24. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan) thu được hợp chất trung gian A25 (51%). LCMS: 487 [M+H]⁺; R_t: 4,22 phút (phương pháp 3).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A16 – Phương pháp B:

Ví dụ A26

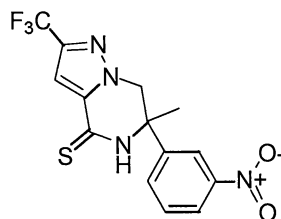
Điều chế hợp chất trung gian A26: rac-6-metyl-6-(3-nitro-phenyl)-2-triflometyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on



Được điều chế từ hợp chất trung gian A25. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM), thu được hợp chất trung gian A26 dưới dạng chất rắn màu trắng (93%). LCMS: 339 [M-H]⁻; R_t: 2,21 phút (phương pháp 3). Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A18 - A21:

Ví dụ A27

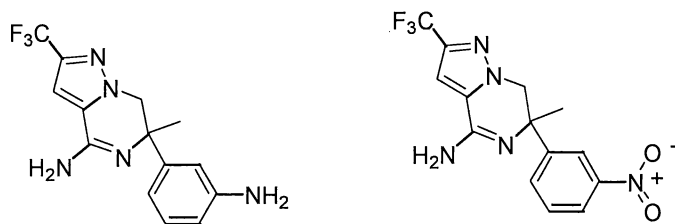
Điều chế hợp chất trung gian A27: rac-6-metyl-6-(3-nitro-phenyl)-2-triflometyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-thion



Được điều chế từ hợp chất trung gian A26. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A27 dưới dạng chất rắn màu vàng (95%). LCMS: 355 [M-H]⁻; R_t: 1,29 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A28

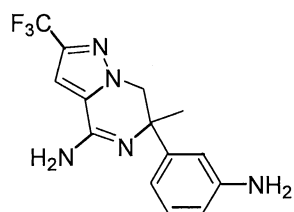
Điều chế hợp chất trung gian A28: rac-6-(3-amino-phenyl)-6-metyl-2-triflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin và hợp chất trung gian A29: 6-metyl-6-(3-nitro-phenyl)-2-triflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



Được điều chế từ hợp chất trung gian A27. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A28 (16%) và hợp chất trung gian A29 (59%). LCMS: A28: 308 [M-H]⁻; R_t: 0,77 phút (phương pháp 2); A29: 338 [M-H]⁻; R_t: 2,28 phút (phương pháp 3),

Ví dụ A29

Điều chế hợp chất trung gian A28: rac-6-(3-amino-phenyl)-6-metyl-2-triflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin

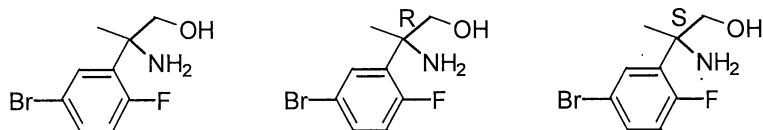


Bổ sung sắt (272 mg, 4,87 mmol) vào hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 29 (340 mg, 1 mmol) và NH₄Cl (100 mg) trong MeOH (20,4 mL) và H₂O (6,8 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ 80°C trong 5 giờ. Sản phẩm thô được làm lạnh và được lọc trên xelit và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH₃ 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không để thu được hợp chất trung gian 28 dưới dạng dầu trong suốt (260 mg, hiệu suất 84%). LCMS: 310 [M+H]⁺; R_t: 2,50 phút (phương pháp 5).

Hợp chất trung gian A30 dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A1 - A4:

Ví dụ A30

Điều chế hợp chất trung gian A30: rac-2-amino-2-(5-bromo-2-fluorophenyl)propan-1-ol, hợp chất trung gian A31: (R)-2-amino-2-(5-bromo-2-fluorophenyl)propan-1-ol và hợp chất trung gian A32 (S) (S)-2-amino-2-(5-bromo-2-fluorophenyl)propan-1-ol:



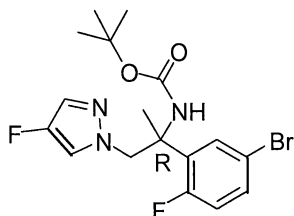
Được điều chế từ 1-(5-bromo-2-fluorophenyl)etanon

Nguyên liệu raxemic này sau đó được tinh chế thêm bằng SFC điều chế trên Chiralpak Diacel AD 20 μ m (2000 g), pha động (70% heptan, 30% EtOH với 0,1% Et₃N). Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A31 (44%) và hợp chất trung gian A32 (44%).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A7 - A12:

Ví dụ A31

Điều chế hợp chất trung gian A33: tert-butyl este của axit (R)-[1-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-(4-fluoropyrazol-1-yl)-1-methyl-ethyl]-carbamic

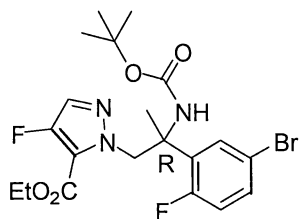


Được điều chế từ hợp chất trung gian A31. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan) thu được hợp chất trung gian A33 dưới dạng dầu trong suốt (55%). LCMS: 418 [M+H]⁺; R_t: 1,57 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A25:

Ví dụ A32

Điều chế hợp chất trung gian A34: Etyl este của axit (R)-2-[2-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-tert-butoxycarbonylamino-propyl]-4-fluor-2H-pyrazol-3-carboxylic

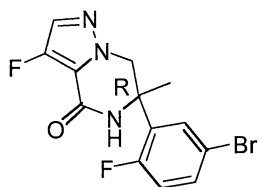


Được điều chế từ hợp chất trung gian A33. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan) thu được hợp chất trung gian A34 dưới dạng dầu trong suốt (67%). LCMS: 490 $[M+H]^+$; R_t : 1,71 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A16 - Phương pháp B:

Ví dụ A33

Điều chế hợp chất trung gian A35: (R)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-3-fluor-6-methyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on

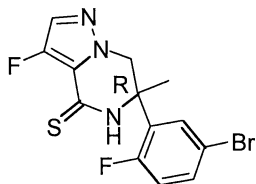


Được điều chế từ hợp chất trung gian A34. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A35 dưới dạng dầu (90%). LCMS: 343 $[M+H]^+$; R_t : 0,96 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A18:

Ví dụ A34

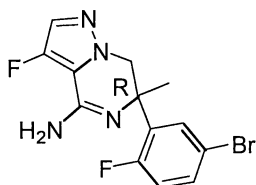
Điều chế hợp chất trung gian A36: (R)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-3-fluor-6-methyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-thion



Được điều chế từ hợp chất trung gian A35. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A36 dưới dạng chất rắn màu vàng (85%). LCMS: 360 $[M+H]^+$; R_t : 1,19 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A35

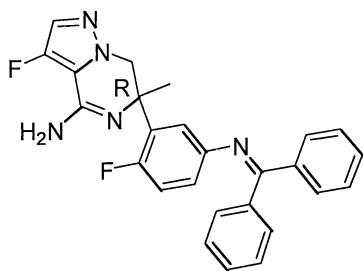
Điều chế hợp chất trung gian A37: (R)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-3-fluoro-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamine



Bổ sung dung dịch nước NH_3 32% (1,5 mL) và dung dịch NH_3 7M trong MeOH (3 mL) vào hợp chất trung gian A36 (330 mg, 0,921 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 100°C trong bình kín trong 6 giờ, sau đó, sau khi làm nguội, dung môi được loại bỏ trong chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký cột (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn để thu được hợp chất trung gian A37 dưới dạng dầu trong suốt (260 mg, 83%). LCMS: 343 $[M+H]^+$; R_t : 1,03 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A36

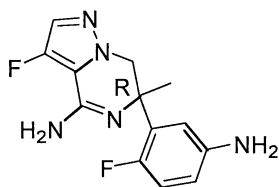
Điều chế hợp chất trung gian A38: (R)-6-[5-(benzhydryliden-amino)-2-fluorophenyl]-3-fluoro-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamine



Bổ sung toluen (58 mL) vào hỗn hợp gồm hợp chất trung gian A37 (3 g, 8,178 mmol), tris(dibenzylidenaxeton)dipaladi (749 mg, 0,818 mmol), 2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl (1,528 g, 2,453 mmol) và natri tert-butoxit (1,415 g, 14,72 mmol) trong bình kín trong môi trường N_2 ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được sục bằng N_2 trong vài phút và sau đó bổ sung benzophenonimin (2,745 mL, 16,356 mmol) và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ $90^\circ C$ trong 18 giờ. Hỗn hợp được cô trong chân không và sau đó hỗn hợp này được pha loãng bằng H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô ($MgSO_4$), lọc và dung môi được cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A38 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (3 g, 83%). LCMS: 442 $[M+H]^+$; R_t : 1,39 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A37

Điều chế hợp chất trung gian A39: (R)-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-3-fluoro-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin

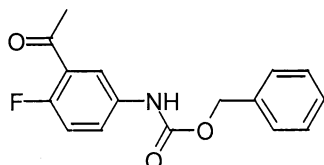


Bổ sung HCl 37% (1,05 mL) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A38 (3 g, 6,795 mmol) trong iPrOH (78 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp được cô, và sau đó được nghiền bằng Et_2O . Chất rắn được lọc ra và được đổ vào iPrOH. Bổ sung $NaHCO_3$ (5,709 g) vào hỗn hợp và hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ, sau đó lọc và phần dịch lọc được cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và

cô trong chân không, thu được dầu màu vàng nhạt. Nguyên liệu này được xử lý bằng hỗn hợp gồm DIPE/Et₂O 3:1 để thu được hợp chất trung gian A39 dưới dạng chất rắn màu vàng (1,1 g, 58%). LCMS: 278 [M+H]⁺; R_t: 0,56 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A38

Điều chế hợp chất trung gian A40: Benzyl este của axit (3-acetyl-4-flo-phenyl)-carbamic

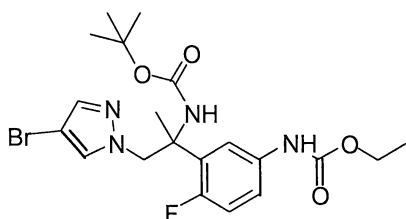


Bổ sung benzyl cloroformat (3 mL, 21,5 mmol) vào hỗn hợp gồm 1-(5-amino-2-flophenyl)etanon (3 g, 19,6 mmol) và tetrabutylamoni bromua ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ, phần thô được xử lý bằng AcOEt (50 mL) và H₂O (50 mL), pha hữu cơ được tách ra và làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không để thu được hợp chất trung gian A40 dưới dạng chất rắn dạng kem (4,7 g, 84%). LCMS: 286 [M-H]⁻; R_t: 2,81 phút (phương pháp 3).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả để tổng hợp chất trung gian **A11**:

Ví dụ A39

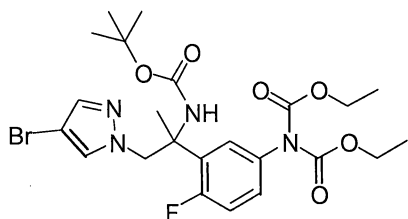
Điều chế hợp chất trung gian A41: Etyl este của axit rac-{3-[2-(4-bromo-pyrazol-1-yl)-1-tert-butoxycarbonylamino-1-metyl-etyl]-4-flo-phenyl}-carbamic



Được điều chế từ hợp chất trung gian A40. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan) tiếp theo là rửa bằng DIPE thu được hợp chất trung gian A41 dưới dạng chất rắn màu trắng (72%). LCMS: 487 $[M+H]^+$; R_t : 3,56 phút (phương pháp 3).

Ví dụ A40

Điều chế hợp chất trung gian A42: rac-ethyl 2-[2-[5-[bis(etoxycarbonyl)amino]-2-flo-phenyl]-2-(tert-butoxycarbonylamino)propyl]-4-bromo-pyrazol-3-carboxylat

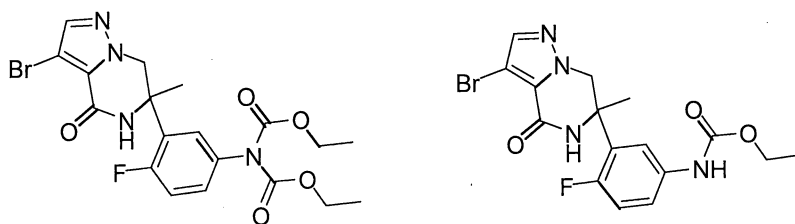


Bổ sung lithi diisopropylamit (2 M trong xyclohexan/etylbenzen/THF, 7,36 mL, 14,721 mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian A41 (2,1 g, 4,327 mmol) trong THF khô (66 mL) ở nhiệt độ -70°C trong môi trường N_2 . Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ -70°C trong 1 giờ, sau đó bổ sung etyl cloroformat (0,91 mL, 9,519 mmol) ở nhiệt độ -70°C và làm ấm hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ -30°C trong 2 giờ. Sản phẩm thô được làm lạnh bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa (30 mL) ở nhiệt độ -50°C và được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng, sản phẩm thô được chiết bằng AcOEt (3 x 20 mL), pha hữu cơ được làm bay hơi trong chân không, làm khô, sản phẩm thô tạo ra được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan). Thu gom các phân đoạn mong muốn và làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A42 (1,6 g, 59%). LCMS: 631 $[M+H]^+$; R_t : 4,22 phút (phương pháp 3).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A16 – Phương pháp B:

Ví dụ A41

Điều chế hợp chất trung gian A43: rac-ethyl *N*-[3-(3-bromo-6-metyl-4-oxo-5,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-*N*-etoxycarbonyl-carbamat và hợp chất trung gian A44: rac-ethyl *N*-[3-(3-bromo-6-metyl-4-oxo-5,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]carbamat

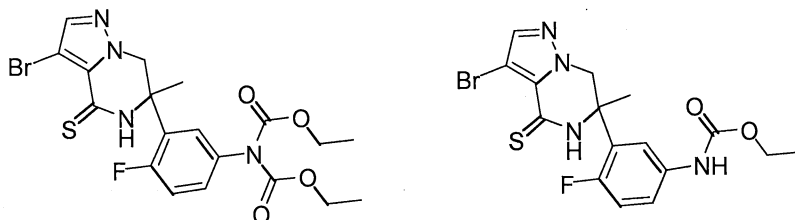


Được điều chế từ hợp chất trung gian A42. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/heptan) thu được hợp chất trung gian A43 dưới dạng chất rắn màu trắng (52%) và hợp chất trung gian A44 dưới dạng chất rắn dạng kem (20%). LCMS: A43: 485 $[M+H]^+$; R_t : 2,15 phút (phương pháp 3); A44: 413 $[M+H]^+$; R_t : 0,98 phút (phương pháp 2)

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A18:

Ví dụ A42

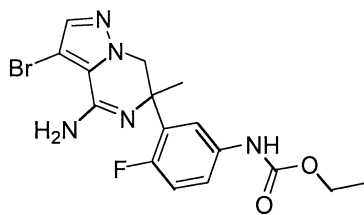
Điều chế hợp chất trung gian A45: rac-ethyl *N*-[3-(3-bromo-6-metyl-4-thioxo-5,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-*N*-etoxycarbonyl-carbamat và hợp chất trung gian A46: rac-ethyl *N*-[3-(3-bromo-6-metyl-4-thioxo-5,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]carbamat



Được điều chế từ hợp chất trung gian A43 và A44. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A45 dưới dạng chất rắn màu vàng (65%) và hợp chất trung gian A46 dưới dạng chất rắn màu vàng (28%). LCMS: A45: 501 $[M+H]^+$; R_t : 2,70 phút (phương pháp 3); A46: 429 $[M+H]^+$; R_t : 2,53 phút (phương pháp 3). Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A35:

Ví dụ A43

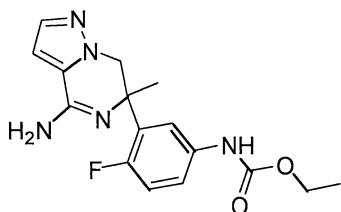
Điều chế hợp chất trung gian A47: Etyl este của axit rac-[3-(4-amino-3-bromo-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-carbamic



Được điều chế từ các hợp chất trung gian A45 và A46. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A47 dưới dạng chất rắn dạng kem, chất này được sử dụng như vậy trong bước tiếp theo. Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A22 – Phương pháp B:

Ví dụ A44

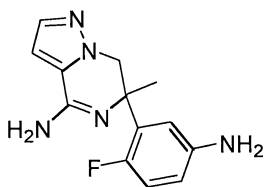
Điều chế hợp chất trung gian A48: Ethyl este của axit rac-[3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flu-phenyl]-carbamic



Được điều chế từ hợp chất trung gian A47. Sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH₃ 7M trong MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A48 dưới dạng dầu (71%). LCMS: 322 [M+H]⁺; R_t: 0,63 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A45

Điều chế hợp chất trung gian A49: 6-(5-amino-2-flu-phenyl)-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



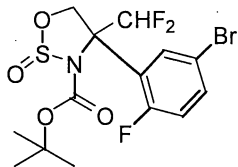
Bổ sung hợp chất trung gian A48 (300 mg, 0,905 mmol) vào dung dịch HCl (6 M trong H₂O, 17,1 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 110°C trong 35 giờ, sau đó dung môi được loại bỏ trong chân không và được xử lý bằng dung dịch

NaHCO₃ bão hòa và được chiết bằng AcOEt (3x 10 mL). Lớp chất hữu cơ được tách ra và làm bay hơi trong chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng sắc ký cột (silica gel; MeOH/DCM). Các phân đoạn mong muốn được thu gom để thu được hợp chất trung gian A49 dưới dạng dầu trong suốt (160 mg, 68%). LCMS: 260 [M+H]⁺; R_t: 0,51 phút (phương pháp 3).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A8:

Ví dụ A46

Điều chế hợp chất trung gian A50: tert-butyl este của axit rac-4-(5-bromo-2-fluorophenyl)-4-diflometyl-2-oxo-2λ⁴-[1,2,3]oxathiazolidin-3-carboxylic

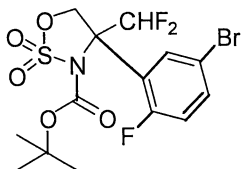


Được điều chế từ axit carbamic, *N*-[1-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2,2-difluoro-1-(hydroxymethyl)ethyl]-, 1,1-dimethylethyl este. Hợp chất trung gian A50 thu được dưới dạng dầu màu vàng (nguyên liệu thô, hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang, 100%).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A9:

Ví dụ A47

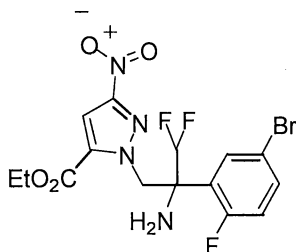
Điều chế hợp chất trung gian A51: tert-butyl este của axit rac-4-(5-bromo-2-fluorophenyl)-4-diflometyl-2,2-dioxo-2λ⁶-[1,2,3]oxathiazolidin-3-carboxylic



Hợp chất này được điều chế từ hợp chất trung gian A50. Nghiền mịn trong heptan, tiếp theo là chạy sắc ký cột (silica gel; DCM) thu được hợp chất trung gian A51 dưới dạng chất rắn màu trắng (78%). LCMS: 465 $[M+NH_4]^+$; R_t : 1,46 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A48

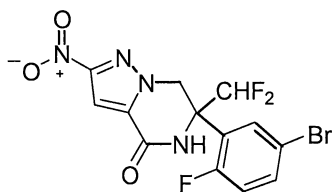
Điều chế hợp chất trung gian A52: rac-1-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2,2-difluoro-1-(5-methyl-3-nitro-pyrazol-1-ylmethyl)-ethylamin



Bổ sung DBU (5,1 mL, 34,103 mmol) vào hợp chất trung gian A51 (6,8 g, 15,238 mmol) và ethyl 5-nitro-1H-pyrazol-3-carboxylat (3,4 g, 18,365 mmol) trong MeCN (150 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 18 giờ. Dung môi sau đó được làm bay hơi trong chân không và bổ sung HCl (4 M trong dioxan, 40 mL) vào phần cặn ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, sau đó dung môi được làm bay hơi trong chân không, bổ sung H₂O và dung dịch Na₂CO₃ bão hòa vào phần cặn, và hỗn hợp được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được làm khô (Na₂SO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM trong heptan 50/50). Thu gom các phân đoạn mong muốn và làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian 52 dưới dạng bột dính (4,6 g, 67%). LCMS: 453 $[M+H]^+$; R_t : 1,46 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A49

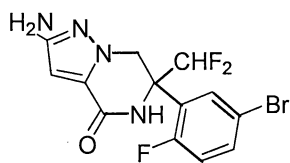
Điều chế hợp chất trung gian A53: rac-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-difluoromethyl-2-nitro-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on



Bổ sung DBU (4,126 mL, 27,6 mmol) vào hỗn hợp đang khuấy gồm hợp chất trung gian A52 (4,15 g, 9,198 mmol) trong MeCN (45 mL) trong bình kín. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 150°C trong 30 phút trong điều kiện chiếu vi sóng. Hỗn hợp được pha loãng bằng dung dịch NH₄Cl 10% và được chiết bằng DCM. Lốp chất hữu cơ được làm khô (Na₂SO₄), lọc và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt). Thu gom các phân đoạn mong muốn và làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A54 (2,48 g, 67%). LCMS: 405 [M-H]⁻; R_t: 1,10 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A50

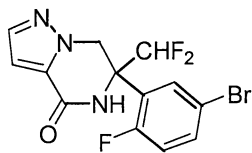
Điều chế hợp chất trung gian A54: rac-2-amino-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-difluoromethyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on



Hợp chất trung gian A53 (2,4 g, 5,924 mmol) được hòa tan trong MeOH (150 mL). Dung dịch này được hydro hóa bằng cột RuO₂ (50°C, chế độ hydro hoàn toàn, 1 ml/phút). Dung môi được làm bay hơi trong chân không và phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A54 dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (2,1 g, 94%). LCMS: 377 [M+H]⁺; R_t: 0,74 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A51

Điều chế hợp chất trung gian A55: rac-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-difluoromethyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on

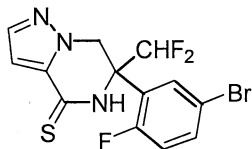


Hỗn hợp gồm hợp chất trung gian A54 (1,8 g, 4,798 mmol), EtOH (36 mL) và H_2SO_4 (0,767 mL) được gia nhiệt đến 90°C . Sau đó bổ sung từng phần natri nitrit (828 mg, 11,995 mmol) và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 90°C trong 20 phút. Sau đó, hỗn hợp này được để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, rót vào dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A55 dưới dạng chất rắn màu trắng (1,25 g, 72%). LCMS: 403 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; R_t : 0,92 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo quy trình tổng hợp được mô tả trong ví dụ A18:

Ví dụ A52

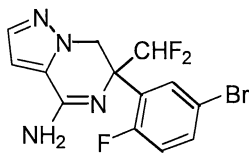
Điều chế hợp chất trung gian A56: rac-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-diflometyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-thion



Được điều chế từ hợp chất trung gian A55. Sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM) thu được hợp chất trung gian 56 dưới dạng chất rắn màu vàng (1,14 g, 88%). LCMS: 419 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; R_t : 1,19 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A53

Điều chế hợp chất trung gian A57: rac-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin

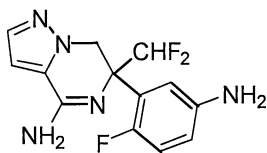


Dung dịch chứa hợp chất trung gian 56 (1,12 g, 2,977 mmol) trong dung dịch NH_3 7M trong MeOH (30 mL) được khuấy trong điều kiện chiếu vi sóng trong 30 phút ở nhiệt độ 120°C . Dung môi được làm bay hơi trong chân không và phần cặn được xử lý bằng DCM và rửa bằng dung dịch Na_2CO_3 loãng. Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian 57 dưới dạng chất rắn màu vàng (1,03 g, 96%). LCMS: 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 0,99 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A36 - A37:

Ví dụ A54

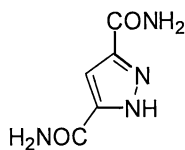
Điều chế hợp chất trung gian A58: rac-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-6-difluoromethyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



Được điều chế từ hợp chất trung gian A54. Sắc ký cột nhanh (silica gel; NH_3 7M trong MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian 58 dưới dạng bột màu trắng nhò (86%). LCMS: 296 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 0,61 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A55

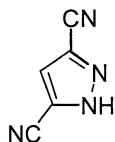
Điều chế hợp chất trung gian A59: Diamit của axit 1H-pyrazol-3,5-dicarboxylic



Diethylpyrazol-3,5-dicarboxylat (5,2 g, 24,5 mmol) được hòa tan trong NH_3 7M trong MeOH và gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ 70°C trong bình kín trong 48 giờ. Dung môi sau đó được làm bay hơi để thu được hợp chất trung gian A59 (3,74 g, 99%) dưới dạng rắn.

Ví dụ A56

Điều chế hợp chất trung gian A60: 1H-pyrazol-3,5-dicarbonitril

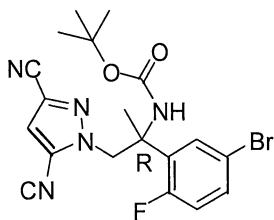


Bổ sung phospho oxyclorea (11,249 mL, 120,679 mmol) vào hỗn hợp gồm hợp chất trung gian 59 (3,72 g, 24,136 mmol) trong MeCN (90 mL) ở nhiệt độ 0°C . Hỗn hợp được khuấy trong bình kín ở 120°C trong 5 giờ (cho đến khi chất rắn biến mất). Hỗn hợp phản ứng được rót vào hỗn hợp gồm đá/ H_2O và được chiết bằng DCM. Lốp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không để thu được hợp chất trung gian A60 dưới dạng rắn, chất rắn này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS: 117 $[\text{M}-\text{H}]^-$; R_t : 0,61 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A7 - A12:

Ví dụ A57

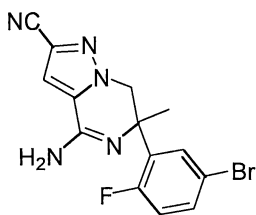
Điều chế hợp chất trung gian A61: tert-butyl este của axit (*R*)-[1-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-(3,5-dicyano-pyrazol-1-yl)-1-metyl-etyl]-carbamic



Được điều chế từ hợp chất trung gian A31. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/DCM) thu được hợp chất trung gian A61 dưới dạng bột (60%). LCMS: 467 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; R_t : 1,57 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A58

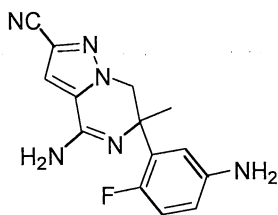
Điều chế hợp chất trung gian A62: (*R*)-4-amino-6-(5-bromo-2-flophenyl)-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-2-carbonitril



Bổ sung axit trifloaxetic (4 mL) vào hỗn hợp đang khuấy gồm hợp chất trung gian A61 (4,483 g, 8,4 mmol) trong DCM (40 mL) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được khuấy trong 20 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được bazơ hóa bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và cô trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; NH_3 7N trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không để thu được hợp chất trung gian A62 (2,9 g, 99%). LCMS: 349 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 1,13 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A59

Điều chế hợp chất trung gian A63: (*R*)-4-amino-6-(5-amino-2-flophenyl)-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-2-carbonitril



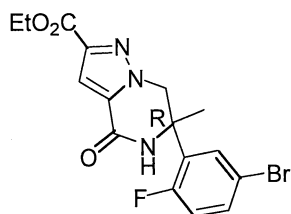
Phản ứng này được tiến hành hai mẻ bằng nhau. Tổng khối lượng của nguyên liệu được sử dụng được ghi lại. Bổ sung CuI (342 mg, 1,795 mmol) vào huyền phù của hợp chất trung gian A62 (500 mg, 1,436 mmol), natri azit (284 mg, 4,308 mmol), *N,N*-dimetyletylenđiamin (255 μL , 2,369 mmol) và Na_2CO_3 (457 mg, 4,308 mmol) trong MeCN (10 mL) và hỗn hợp phản ứng này được khử khí. Gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ 110°C trong 4 giờ, sau đó, ở nhiệt độ 120°C trong 2 giờ nữa. Hỗn hợp này sau đó được ngừng bằng dung dịch 1M HCl và bazơ hóa lớp nước bằng NH_4OH và chiết bằng AcOEt

(3x). Các lớp chất hữu cơ được gom lại được làm khô (MgSO_4), lọc và cô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH_3 nồng độ 7N trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A63 (300 mg, 65%). LCMS: 285 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 0,74 phút (phương pháp 2).

Hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp được mô tả trong các ví dụ A7 - A9, A11, A13 và A15:

Ví dụ A60

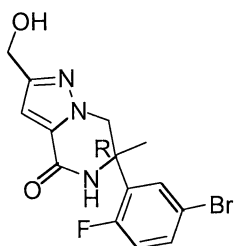
Điều chế hợp chất trung gian A64: Ethyl este của axit (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-metyl-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-2-carboxylic



Được điều chế từ diethylpyrazol-3,5-dicarboxylat. Hợp chất trung gian A64 được dùng dưới dạng chất rắn thô màu trắng trong phản ứng sau đó.

Ví dụ A61

Điều chế hợp chất trung gian A65: (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-hydroxymetyl-6-metyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on

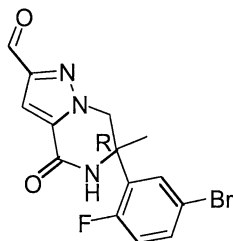


Bổ sung natri bohydrua (3,094 g, 81,774 mmol) vào dung dịch đang khuấy chứa hợp chất trung gian 64 (3,6 g, 9,086 mmol) trong THF (10 mL) và MeOH (5 mL) ở nhiệt độ 0°C . Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C , được xử lý bằng H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ này

được làm khô (Na_2SO_4), lọc và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất trung gian A65 (3,2 g, 99%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Ví dụ A62

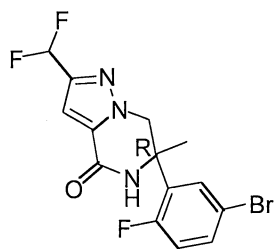
Điều chế hợp chất trung gian A66: (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-6-methyl-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-2-carbaldehyt



Bổ sung mangan dioxit (7 g, 80,5 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A65 (3,2 g, 9,035 mmol) trong cloroform (48 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ 62°C trong 4 giờ. Hỗn hợp này được lọc qua xelit và rửa bằng DCM. Lớp chất hữu cơ này được cô, thu được hợp chất trung gian A66 dưới dạng chất rắn nổi tuyệt màu cam nhạt (2,3 g, 72%).

Ví dụ A63

Điều chế hợp chất trung gian A67: (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-diflometyl-6-metyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-on

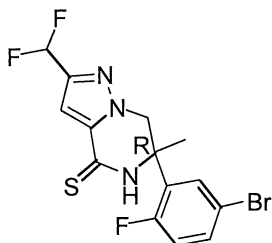


Dung dịch chứa hợp chất trung gian A66 (2,3 g, 6,531 mmol) trong DCM (50ml) và DAST (2,193 mL, 16,328 mmol) trong DCM (50ml) được bơm qua thiết bị điều biến hóa học dòng chảy Vapourtec R2+R4, cuộn 10 mL ở nhiệt độ 80°C, Rt = 15 phút. Dung dịch chảy ra được thu gom trên CaCO_3 . Dung dịch này được lọc qua xelit và rửa bằng DCM, Lớp chất hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa và được chiết bằng

DCM. Lọc chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4 , lọc và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A67 (2,2 g, 90%) dưới dạng dầu màu nâu.

Ví dụ A64

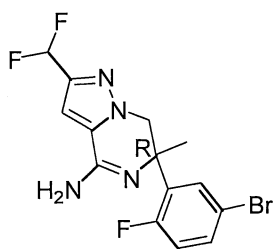
Điều chế hợp chất trung gian A68: (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-difluoromethyl-6-methyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-thion



Bổ sung phospho pentasulfua (1,871 g, 8,419 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A67 (2,1 g, 5,613 mmol) trong dioxan (1 mL) và gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ 100°C trong 18 giờ. Hỗn hợp được cô trong chân không và được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A68 (2g, 91%) dưới dạng dầu màu vàng. LCMS: 392 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 1,29 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A65

Điều chế hợp chất trung gian A69: (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-2-difluoromethyl-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin



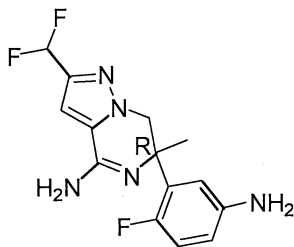
Phản ứng này được thực hiện hai mẻ bằng nhau. Tổng khối lượng của nguyên liệu sử dụng được ghi lại. Bổ sung NH_3 (2M trong EtOH, 30mL, 60mmol) vào hợp chất trung gian A69 (2 g, 5,125 mmol) và NH_4Cl (2,173 g, 41 mmol). Hỗn hợp này được gia nhiệt trong điều kiện chiếu vi sóng ở nhiệt độ 170°C trong 45 phút. Hỗn hợp được cô, và bổ sung thêm 30 mL NH_3 (2 M trong EtOH). Hỗn hợp được gia nhiệt trong điều kiện chiếu

vi sóng ở nhiệt độ 170°C trong 45 phút. Quy trình được lặp lại 4 lần trong tổng thời gian là 180 phút. Hỗn hợp được lọc và phần dịch lọc này được cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A69 (1g, 52%) dưới dạng dầu. LCMS: 375 $[M+H]^+$; R_t : 1,11 phút (phương pháp 2).

Các hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp tương tự với quy trình được mô tả trong ví dụ A59:

Ví dụ A66

Điều chế hợp chất trung gian A70: (*R*)-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-2-difluoromethyl-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin

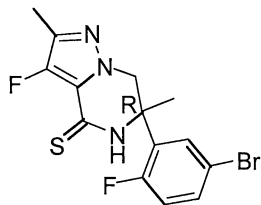


Được điều chế từ hợp chất trung gian A69. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A70 dưới dạng dầu (51%). LCMS: 310 $[M+H]^+$; R_t : 0,69 phút (phương pháp 2).

Các hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp tương tự với quy trình được mô tả trong các ví dụ A7 - A11, A48, A15 và A18:

Ví dụ A67

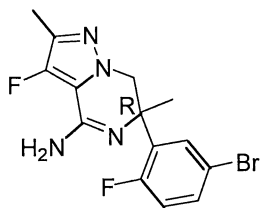
Điều chế hợp chất trung gian A71: (*R*)-6-(5-bromo-2-fluorophenyl)-3-fluoro-2,6-dimethyl-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-thion



Được điều chế từ etyl este của axit 4-flo-5-metyl-1H-pyrazol-3-carboxylic. Sắc ký cột nhanh (silica gel; AcOEt/DCM) thu được hợp chất trung gian A71 dưới dạng chất rắn màu vàng (92%). LCMS: 374 $[M+H]^+$; R_t : 1,27 phút (phương pháp 2).

Ví dụ A68

Điều chế hợp chất trung gian A72: (*R*)-6-(5-bromo-2-flo-phenyl)-3-flo-2,6-dimetyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin

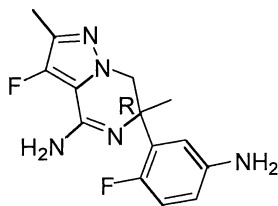


Bổ sung NH_3 (2 M trong EtOH, 10 đương lượng) vào dung dịch chứa hợp chất trung gian 71 (2,4 g, 6,448 mmol) và NH_4Cl (4 đương lượng) và gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ $85^\circ C$ trong bình kín trong 24 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không và phần cặn được tạo huyền phù trong DCM và rửa bằng H_2O . Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô ($MgSO_4$), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Bổ sung thêm NH_4Cl (4 đương lượng) tiếp theo là NH_3 (2 M trong EtOH, 10 đương lượng) vào phần cặn và gia nhiệt hỗn hợp này ở nhiệt độ $85^\circ C$ trong bình kín trong 24 giờ. Lặp lại quy trình này 4 lần nữa với tổng lượng NH_3 (2 M trong EtOH) là 276 mL, và 8,277 g NH_4Cl . Sản phẩm sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không, thu được hợp chất trung gian A72 (960 mg, 42%) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. LCMS: 357 $[M+H]^+$; R_t : 1,11 phút (phương pháp 2).

Các hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp tương tự với quy trình được mô tả trong các ví dụ A36 - A37:

Ví dụ A69

Điều chế hợp chất trung gian A73: (*R*)-6-(5-amino-2-flo-phenyl)-3-flo-2,6-dimetyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamin

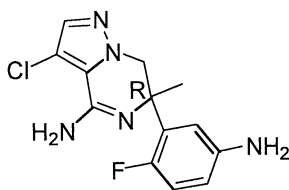


Được điều chế từ hợp chất trung gian A72. Sắc ký cột nhanh (silica gel; NH_3 7N trong MeOH/DCM) thu được hợp chất trung gian A73 dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (42%).

Các hợp chất trung gian dưới đây được điều chế theo các quy trình tổng hợp tương tự với quy trình được mô tả trong các ví dụ A7 – A9, A48, A23, A16B. A18, A21, A36, A37:

Ví dụ A70

Điều chế hợp chất trung gian A74: (*R*)-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-3-chloro-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamine

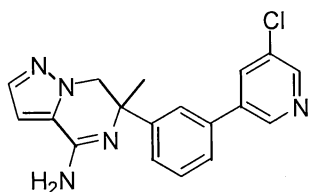


Được điều chế từ hợp chất trung gian A31. Sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) tiếp theo là nghiền mịn trong DIPE/ Et_2O thu được hợp chất trung gian A74 dưới dạng chất rắn màu vàng (94%). LCMS: 294 $[\text{M}+\text{H}]^+$; R_t : 1,13 phút (phương pháp 3).

Điều chế các hợp chất cuối cùng

Ví dụ B1

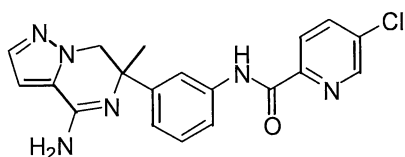
Điều chế hợp chất 1: muối (*R*)-6-[3-(5-chloro-pyridin-3-yl)-phenyl]-6-methyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4-ylamine trifluoacetat



Bổ sung dung dịch nước NH_3 32% (0,5 mL) vào hỗn hợp đang khuấy gồm hợp chất trung gian A18 (60 mg, 0,17 mmol) trong dung dịch NH_3 7M trong MeOH (1,5 mL) trong bình kín. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 100°C trong 5 giờ. Sau khi để nguội xuống nhiệt độ trong phòng, dung môi được làm bay hơi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột ngắn (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không để tạo ra phân đoạn, mà được tinh chế thêm bằng HPLC pha đảo (Gradient từ 80% dung dịch TFA 0,1% trong H_2O , CH_3CN 20% đến 0% dung dịch TFA 0,1% trong H_2O , CH_3CN 100%) và nghiền với DIPE, thu được hợp chất 1 (36 mg, hiệu suất 46%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,79 (s, 3 H), 4,69 (d, $J=13,6$ Hz, 1 H), 5,25 (d, $J=13,9$ Hz, 1 H), 7,23 (d, $J=2,3$ Hz, 1 H), 7,45 (br. d, $J=8,7$ Hz, 1 H), 7,52 (t, $J=7,8$ Hz, 1 H), 7,69 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 7,75 (br. d, $J=7,8$ Hz, 1 H), 7,94 - 7,96 (m, 1 H), 8,28 (t, $J=2,2$ Hz, 1 H), 8,66 (d, $J=2,3$ Hz, 1 H), 8,88 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 9,28 (br. s, 1 H), 9,87 (br. s, 1 H), 11,06 (br. s, 1 H).

Ví dụ B2

Điều chế hợp chất 2: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit rac-5-clo-pyridin-2-carboxylic

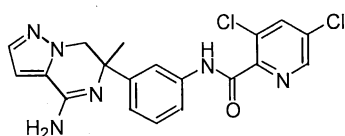


Bổ sung axit 5-clo-pyridin-2-carboxylic (71,8 mg, 0,68 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (137 mg, 0,5 mmol) trong MeOH (4 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A22 (100 mg, 0,41 mmol) trong MeOH (3 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 3 giờ. Hỗn hợp này được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et_2O và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không và phân đoạn thu được được tinh chế thêm bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu

gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất 2 (21 mg, hiệu suất 13%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 1,67 (s, 3 H), 4,38 (d, $J=13,3$ Hz, 1 H), 4,53 (d, $J=13,3$ Hz, 1 H), 4,79 (br. s, 2H), 6,72 (br. s, 1 H), 7,24 (br. d, $J=7,8$ Hz, 1 H), 7,34 (t, $J=7,9$ Hz, 1 H), 7,51 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 7,73 (dd, $J=8,1, 1,2$ Hz, 1 H), 7,85 - 7,90 (m, 2 H), 8,23 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 8,55 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 9,86 (br. s, 1 H).

Ví dụ B3

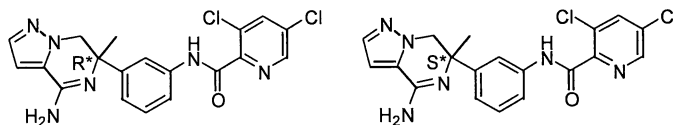
Điều chế hợp chất 3: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit rac-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic



Bổ sung axit 3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic (112 mg, 0,58 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (176,2 mg, 0,64 mmol) trong MeOH (5 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A22 (128 mg, 0,53 mmol) trong MeOH (5 mL). Hỗn hợp được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 3 giờ. Hỗn hợp này được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et_2O và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất 3 (180 mg, hiệu suất 82%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,41 (s, 3 H), 4,12 - 4,45 (m, 2 H), 6,54 (br. s., 2 H), 6,64 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 7,25 - 7,32 (m, 2 H), 7,45 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 7,63 (m, $J=6,3, 2,5, 2,5$ Hz, 1 H), 7,82 (br. s, 1 H), 8,43 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 8,72 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 10,64 (br. s., 1 H).

Ví dụ B4

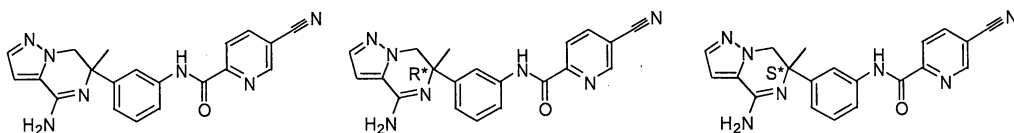
Điều chế hợp chất 4: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit (R*)-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 5: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit (S*)-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic



Một mẫu hợp chất 3 (0,58 g) được rửa bằng DCM lạnh và sau đó bằng Et₂O. hợp chất raxemic này sau đó được tách ra thành các chất đồng phân đối ảnh tương ứng bằng SFC điều chế trên Chiralpak AD-H 5μm (250 x 20 mm), pha động (0,3% iPrNH₂, 60% CO₂, 40% EtOH). Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không, thu được hợp chất 4 (152 mg, hiệu suất 26%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,41 (s, 3 H), 4,28 (br. s, 2 H), 6,41 (br. s., 2 H), 6,64 (d, *J*=1,4 Hz, 1 H), 7,30 (s, 2 H), 7,45 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H), 7,60 - 7,67 (m, 1 H), 7,83 (s, 1 H), 8,44 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H), 8,73 (d, *J*=2,3 Hz, 1 H), 10,65 (br. s., 1 H) và hợp chất 5 (155 mg, hiệu suất 27%) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,41 (s, 3 H), 4,28 (s, 2 H), 6,41 (br. s., 2 H), 6,64 (d, *J*=0,9 Hz, 1 H), 7,26 - 7,33 (m, 2 H), 7,45 (d, *J*=1,4 Hz, 1 H), 7,59 - 7,69 (m, 1 H), 7,84 (s, 1 H), 8,44 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H), 8,73 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H), 10,65 (br. s., 1 H) cả hai chất đồng phân đối ảnh này đều ở dạng chất rắn màu trắng.

Ví dụ B5

Điều chế hợp chất 6: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit rac-5-xyano-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 7: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit (R*)-5-xyano-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 8: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit (S*)-5-xyano-pyridin-2-carboxylic

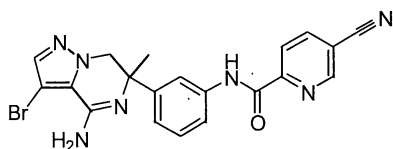


Bổ sung axit 5-xyano-pyridin-2-carboxylic (187,8 mg, 1,27 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (412,9 mg,

1,49 mmol) trong MeOH (20 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A22 (300 mg, 1,24 mmol) trong MeOH (10 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch Na₂CO₃ bão hòa và H₂O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et₂O và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; dung dịch NH₃ 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm này được rửa bằng EtOH và Et₂O và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được hợp chất 6 (122 mg, hiệu suất 26%) dưới dạng chất rắn màu kem. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,42 (s, 3 H), 4,31 (m, *J*=3,5 Hz, 2 H), 6,66 (br. s, 2 H), 6,66 (d, *J*=1,7 Hz, 1 H), 7,26 - 7,33 (m, 2 H), 7,45 (d, *J*=2,0 Hz, 1 H), 7,78 (dt, *J*=6,9, 1,9 Hz, 1 H), 8,01 - 8,06 (m, 1 H), 8,29 (dd, *J*=8,1, 0,6 Hz, 1 H), 8,59 (dd, *J*=8,1, 2,0 Hz, 1 H), 9,18 - 9,22 (m, 1 H), 10,68 (s, 1 H). Hợp chất raxemic này sau đó được tinh chế thêm bằng SFC điều chế trên Chiralpak AD-H 5μm (250 x 20 mm), pha động (0,3% iPrNH₂, 60% CO₂, 40% EtOH). Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không, thu được hợp chất 7 (45,8 mg, hiệu suất 10%) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,41 (s, 3 H), 4,21 - 4,35 (m, 2 H), 6,39 (br. s., 2 H), 6,64 (br. s, 1 H), 7,26 - 7,35 (m, 2 H), 7,45 (d, *J*=1,2 Hz, 1 H), 7,78 (br. d, *J*=7,2 Hz, 1 H), 8,05 (br. s, 1 H), 8,30 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H), 8,60 (dd, *J*=8,1, 2,0 Hz, 1 H), 9,20 - 9,22 (m, 1 H), 10,68 (s, 1 H) và hợp chất 8 (46,5 mg, hiệu suất 10%) ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,41 (s, 3 H), 4,29 (br. s., 2 H), 6,41 (br. s., 2 H), 6,64 (d, *J*=1,7 Hz, 1 H), 7,27 - 7,34 (m, 2 H), 7,45 (d, *J*=1,7 Hz, 1 H), 7,77 - 7,80 (m, 1 H), 8,05 (br. s, 1 H), 8,30 (dd, *J*=8,2, 0,7 Hz, 1 H), 8,60 (dd, *J*=8,1, 2,0 Hz, 1 H), 9,19 - 9,24 (m, 1 H), 10,68 (s, 1 H), cả hai hợp chất này đều ở dạng chất rắn màu trắng.

Ví dụ B6

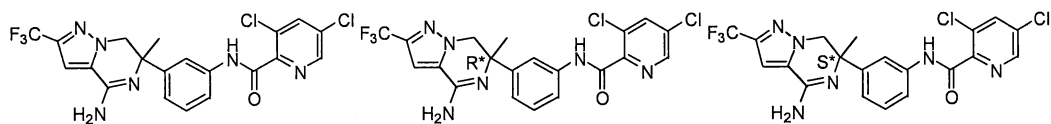
Điều chế hợp chất 9: muối trifloxetat [3-(4-amino-3-bromo-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit rac-5-xyano-pyridin-2-carboxylic



Bổ sung axit 5-xyano-pyridin-2-carboxylic (23,6 mg, 0,16 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (51,9 mg, 0,19 mmol) trong MeOH (5 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A20 (50 mg, 0,16 mmol) trong MeOH (5 mL). Hỗn hợp được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lóp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et_2O và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không và phần cặn được tinh chế bằng HPLC điều chế (RP C18 XSelect 19 x 100 5 μm), pha động (gradien từ 80% dung dịch TFA 0,1% trong H_2O , 20% CH_3CN đến 0% dung dịch TFA 0,1% trong H_2O , CH_3CN 100%) thu được hợp chất 9 (9,8 mg, hiệu suất 11%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,75 (s, 3 H), 4,74 (d, $J=13,9$ Hz, 1 H), 5,09 (d, $J=13,6$ Hz, 1 H), 7,19 - 7,24 (m, 1 H), 7,40 (t, $J=8,1$ Hz, 1 H), 7,87 (dd, $J=8,1, 1,2$ Hz, 1 H), 7,88 (s, 1 H), 8,00 (br. s, 1 H), 8,29 (dd, $J=8,1, 0,6$ Hz, 1 H), 8,60 (dd, $J=8,4, 2,0$ Hz, 1 H), 8,78 (br. s., 1 H), 9,21 (dd, $J=2,0, 0,9$ Hz, 1 H), 9,70 (br. s., 1 H), 10,89 (s, 1 H), 11,23 (br. s., 1 H).

Ví dụ B7

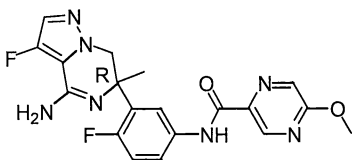
Điều chế hợp chất 10: [3-(4-amino-6-metyl-2-triflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit *rac*-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 11: [3-(4-amino-6-metyl-2-triflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit (R^*)-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 12: [3-(4-amino-6-metyl-2-triflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-phenyl]-amit của axit (S^*)-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic



Bổ sung axit 3,5-diclo-2-pyridincarboxylic (70 mg, 0,366 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (119 mg, 0,431 mmol) trong MeOH (5 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A28 (111 mg, 0,359 mmol) trong MeOH (5 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ. Hỗn hợp này được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et_2O , được siêu âm, lọc và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C tạo ra hợp chất 10 (95 mg, hiệu suất 55%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất raxemic này sau đó được tinh chế thêm bằng SFC điều chế trên Chiralpak AD-H 5 μm (250 x 20 mm), pha động (0,3% $i\text{PrNH}_2$, 70% CO_2 , 30% $i\text{PrOH}$). Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không, thu được hợp chất 11 (40 mg, hiệu suất 22%), ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,42 (s, 3 H), 4,35 - 4,47 (m, 2 H), 6,61 (br. s., 2 H), 7,09 (br. s, 1 H), 7,26 - 7,35 (m, 2 H), 7,59 - 7,67 (m, 1 H), 7,83 (br. s, 1 H), 8,43 (d, $J=2,1$ Hz, 1 H), 8,72 (d, $J=2,1$ Hz, 1 H), 10,67 (s, 1 H) và hợp chất 12 (38 mg, hiệu suất 22%), ^1H NMR của hợp chất 12 giống với ^1H NMR của hợp chất 11.

Ví dụ B8

Điều chế hợp chất 13: [3-(4-amino-3-flo-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (*R*)-5-metoxy-pyrazin-2-carboxylic

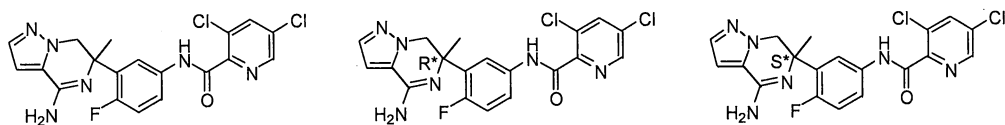


Bổ sung axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (120 mg, 0,78 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (233 mg, 0,841

mmol) trong MeOH (5 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A39 (212 mg, 0,764 mmol) trong MeOH (5 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch Na₂CO₃ bão hòa và H₂O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et₂O và sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và cô trong chân không để thu được chất rắn màu trắng. Chất rắn này được xử lý bằng DIPE để thu được hợp chất 13 (155 mg, 49%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,59 (s, 3 H), 4,06 (s, 3 H), 4,28 (br. d, *J*=13,0 Hz, 1 H), 4,51 (br. d, *J*=13,0 Hz, 1 H), 5,04 (br. s., 2 H), 7,09 (dd, *J*=11,6, 9,0 Hz, 1 H), 7,36 (d, *J*=4,0 Hz, 1 H), 7,84 - 7,97 (m, 2 H), 8,12 (d, *J*=1,2 Hz, 1 H), 8,99 (d, *J*=1,2 Hz, 1 H), 9,51 (br. s, 1 H).

Ví dụ B9

Điều chế hợp chất 14: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit *rac*-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 15: (R*)-[3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit 3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 16: [3-(4-amino-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (S*)-3,5-diclo-pyridin-2-carboxylic

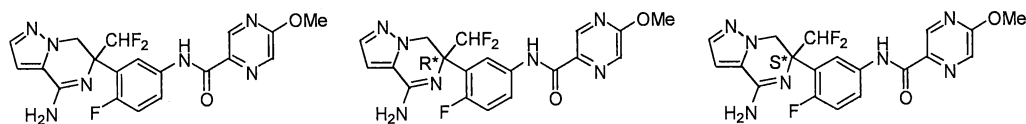


Bổ sung axit 3,5-diclo-2-pyridincarboxylic (75,5 mg, 0,393 mmol) vào dung dịch chứa 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (128 mg, 0,463 mmol) trong MeOH (5 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A49 (100 mg, 0,386 mmol) trong MeOH (5 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ. Hỗn hợp được xử lý bằng dung dịch

Na₂CO₃ bão hòa và H₂O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thô được nghiền với Et₂O, được siêu âm, lọc và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C. Hợp chất tạo ra được tinh chế một lần nữa bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM) để thu được, sau khi xử lý bằng AcOEt và DIPE, hợp chất 14 (95 mg, hiệu suất 57%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất raxemic này sau đó được tinh chế thêm bằng SFC điều chế trên Chiralcel OJ-H 5 µm (250 x 20 mm), pha động (0,3% iPrNH₂, 85% CO₂, 15% EtOH). Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không, thu được hợp chất 15 (38 mg, hiệu suất 23%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,58 (s, 3 H), 2,52 (br. s., 2 H), 4,41 (br. d, *J*=13,2 Hz, 1 H), 4,62 (dd, *J*=13,2, 0,9 Hz, 1 H), 6,43 (d, *J*=2,1 Hz, 1 H), 7,08 (dd, *J*=11,7, 8,9 Hz, 1 H), 7,52 (d, *J*=2,1 Hz, 1 H), 7,81 (dd, *J*=6,9, 2,8 Hz, 1 H), 7,89 (d, *J*=2,1 Hz, 1 H), 7,94 (ddd, *J*=8,8, 4,1, 3,0 Hz, 1 H), 8,42 (d, *J*=2,1 Hz, 1 H), 9,71 (br. s., 1 H) và hợp chất 16 (40 mg, hiệu suất 24%), ¹H NMR của hợp chất 16 là giống như ¹H NMR của hợp chất 15.

Ví dụ B10

Điều chế hợp chất 17: [3-(4-amino-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit *rac*-5-metoxy-pyrazin-2-carboxylic và hợp chất 18: [3-(4-amino-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (R*)-5-metoxy-pyrazin-2-carboxylic và hợp chất 19: [3-(4-amino-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (S*)-5-metoxy-pyrazin-2-carboxylic

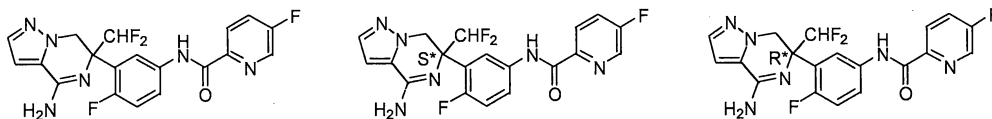


Bổ sung axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (187,9 mg, 1,219 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (337 mg, 1,219 mmol) trong MeOH (6 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A58 (300 mg, 1,016 mmol) trong MeOH (4 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ

trong phòng và được khuấy trong 1 giờ, sau đó được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Một phần của sản phẩm này được kết tủa bằng DCM và nguyên liệu thô còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thu được được gộp chung với sản phẩm thu được bằng cách kết tủa và được nghiền với heptan, được siêu âm và được lọc, để thu được hợp chất 17 (278 mg, hiệu suất 62%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất raxemic này sau đó được tinh chế thêm bằng SFC điều chế trên Chiralcel OD-H 5 μm (250 x 20 mm), pha động (0,3% $i\text{PrNH}_2$, 70% CO_2 , 30% EtOH). Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không, thu được hợp chất 18 (103 mg, hiệu suất 23%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 4,03 (s, 3 H) 4,58 (br. d, $J=13,6$ Hz, 1 H) 4,75 (br. d, $J=13,6$ Hz, 1 H) 6,27 (t, $J=55,5$ Hz, 1 H) 6,68 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 6,93 (br. s, 2 H) 7,20 (dd, $J=11,8$, 9,0 Hz, 1 H) 7,48 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H) 7,78 (dt, $J=8,4$, 3,6 Hz, 1 H) 8,17 (dd, $J=7,1$, 2,7 Hz, 1 H) 8,42 (d, $J=1,2$ Hz, 1 H) 8,88 (d, $J=1,2$ Hz, 1 H) 10,51 (s, 1 H) và hợp chất 19 (102 mg, hiệu suất 23%), ^1H NMR của hợp chất 19 là giống với ^1H NMR của hợp chất 18.

Ví dụ B11

Điều chế hợp chất 20: [3-(4-amino-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit rac-5-flo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 21: [3-(4-amino-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (S^*)-5-flo-pyridin-2-carboxylic và hợp chất 22: [3-(4-amino-6-diflometyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (R^*)-5-flo-pyridin-2-carboxylic

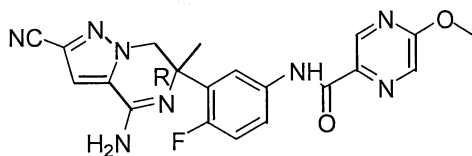


Bổ sung axit 5-flo-2-pyridincarboxylic (74,5 mg, 0,528 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (146 mg, 0,528 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian

A58 (130 mg, 0,44 mmol) trong MeOH (2 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 1 giờ, sau đó được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và H_2O và được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; 7 M NH_3 trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Sản phẩm thu được được nghiền với heptan, được siêu âm và được lọc, để thu được hợp chất 17 (112 mg, hiệu suất 60%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hợp chất raxemic này sau đó được tinh chế thêm bằng SFC điều chế trên cột Chiralpak AD-H (5 μm , 250 x 20 mm), pha động [70% CO_2 , 30% EtOH (+ 0,3% iPrNH_2)]. Các phân đoạn mong muốn của mỗi chất đồng phân đối ảnh được thu gom và cô trong chân không thu được hợp chất 21 (41 mg, hiệu suất 22%), ^1H NMR của hợp chất 21 giống với ^1H NMR của hợp chất 22, và hợp chất 22 (43 mg, hiệu suất 23%). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 4,53 - 4,61 (m, 1 H), 4,74 (br. d, $J=13,4$ Hz, 1 H), 6,26 (t, $J=55,9$ Hz, 1 H), 6,67 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H), 6,93 (br. s, 2 H), 7,20 (dd, $J=12,0$, 9,0 Hz, 1 H), 7,47 (d, $J=1,8$ Hz, 1 H), 7,79 (ddd, $J=8,8$, 3,9, 2,8 Hz, 1 H), 7,98 (td, $J=8,7$, 2,9 Hz, 1 H), 8,16 (dd, $J=7,1$, 2,7 Hz, 1 H), 8,21 (dd, $J=8,8$, 4,6 Hz, 1 H), 8,73 (d, $J=2,8$ Hz, 1 H), 10,62 (br. s, 1 H).

Ví dụ B12

Điều chế hợp chất 23: [3-(4-amino-2-xyano-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (*R*)-5-metoxypyrazin-2-carboxylic

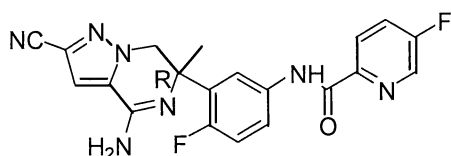


Bổ sung axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (95,4 mg, 0,619 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (171,3 mg, 0,619 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A63 (160 mg, 0,563 mmol) trong MeOH (3 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 20 giờ, sau đó được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và được khuấy trong vài phút. Hỗn hợp này sau đó được chiết bằng

DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, sau khi làm khô, thu được hợp chất 23 (115 mg, hiệu suất 49%) dưới dạng chất rắn. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 1,58 (s, 3 H), 1,66 (br. s., 2 H), 4,07 (s, 3 H), 4,47 (br. d, $J=13,6$ Hz, 1 H), 4,66 (br. d, $J=13,3$ Hz, 1 H), 6,81 (br. s, 1 H), 7,09 (dd, $J=11,6, 9,0$ Hz, 1 H), 7,75 - 7,81 (m, 1 H), 7,97 (dd, $J=7,1, 2,7$ Hz, 1 H), 8,14 (s, 1 H), 9,00 (s, 1 H), 9,49 (br. s., 1 H).

Ví dụ B13

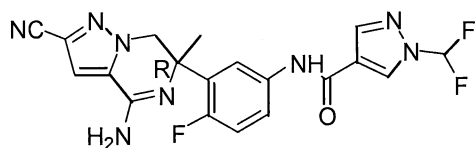
Điều chế hợp chất 24: [3-(4-amino-2-xyano-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo [1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flu-phenyl]-amit của axit (*R*)-5-flu-pyridin-2-carboxylic



Bổ sung axit 5-flu-2-pyridincarboxylic (87,4 mg, 0,619 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (171,3 mg, 0,619 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A63 (160 mg, 0,563 mmol) trong MeOH (3 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 20 giờ, sau đó được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và được khuấy trong vài phút. Hỗn hợp này sau đó được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, để thu được dầu, dầu này được nghiền với DIPE. Chất rắn thu được được lọc và được làm khô để thu được hợp chất 24 (95 mg, hiệu suất 41%) dưới dạng chất rắn. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 1,58 (br. s, 3 H) 4,46 (br. d, $J=13,4$ Hz, 1 H) 4,66 (d, $J=13,4$ Hz, 1 H) 4,90 (br. s., 2 H) 6,81 (s, 1 H) 7,10 (dd, $J=11,8, 8,8$ Hz, 1 H) 7,60 (td, $J=8,3, 2,8$ Hz, 1 H) 7,78 - 7,86 (m, 1 H) 7,96 (dd, $J=7,1, 2,7$ Hz, 1 H) 8,32 (dd, $J=8,7, 4,5$ Hz, 1 H) 8,45 (d, $J=2,8$ Hz, 1 H) 9,80 (br. s, 1 H).

Ví dụ B14

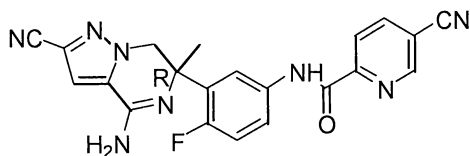
Điều chế hợp chất 25: [3-(4-amino-2-xyano-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo [1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (*R*)-1-diflometyl-1H-pyrazol-4-carboxylic



Bổ sung axit 1-diflometyl-1H-pyrazol-3-carboxylic (82,7 mg, 0,51 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (155 mg, 0,561 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A63 (145 mg, 0,51 mmol) trong MeOH (3 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 3 giờ, sau đó được xử lý bằng dung dịch Na₂CO₃ bão hòa và được khuấy trong vài phút. Hỗn hợp này sau đó được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO₄), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được dầu, dầu này được nghiền với heptan. Chất rắn tạo ra được lọc và được làm khô để thu được hợp chất 25 (100 mg, hiệu suất 46%) dưới dạng chất rắn. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,58 (s, 3 H) 4,47 (br. d, *J*=13,3 Hz, 1 H) 4,65 (d, *J*=13,3 Hz, 1 H) 4,94 (br. s., 2 H) 6,81 (s, 1 H) 7,05 (d, *J*=2,6 Hz, 1 H) 7,09 (dd, *J*=11,6, 9,0 Hz, 1 H) 7,20 (t, *J*=60,4 Hz, 1 H) 7,69 - 7,75 (m, 1 H) 7,88 (d, *J*=2,6 Hz, 1 H) 7,91 (dd, *J*=6,8, 2,2 Hz, 1 H) 8,62 (br. s, 1 H).

Ví dụ B15

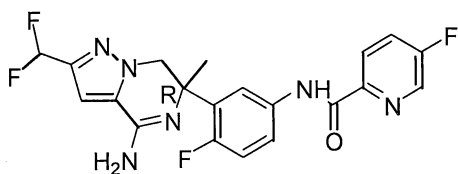
Điều chế hợp chất 26: [3-(4-amino-2-xyano-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (*R*)-5-xyano-pyridin-2-carboxylic



Bổ sung axit 5-xyno-2-pyridincarboxylic (79,7 mg, 0,538 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (163,8 mg, 0,592 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A63 (153 mg, 0,538 mmol) trong MeOH (3 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 3 giờ, sau đó được xử lý bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa và được khuấy trong vài phút. Hỗn hợp này sau đó được chiết bằng DCM. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và làm bay hơi dung môi trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được dầu, dầu này được nghiền với heptan. Chất rắn tạo ra được lọc và được làm khô để thu được hợp chất 26 (63 mg, hiệu suất 28%) dưới dạng chất rắn. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,47 (br. s, 3 H) 4,43 - 4,55 (m, 2 H) 6,76 (br. s., 2 H) 7,20 (dd, $J=11,8, 9,0$ Hz, 1 H) 7,27 (br. s, 1 H) 7,71 - 7,79 (m, 1 H) 8,10 (br. d, $J=5,2$ Hz, 1 H) 8,26 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H) 8,57 (dd, $J=8,2, 1,6$ Hz, 1 H) 9,18 (br. s, 1 H) 10,81 (br. s, 1 H).

Ví dụ B16

Điều chế hợp chất 27: [3-(4-amino-2-diflometyl-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (*R*)-5-flo-pyridin-2-carboxylic

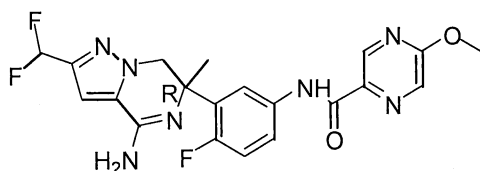


Bổ sung axit 5-flo-2-pyridincarboxylic (68 mg, 0,485 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (148 mg, 0,533 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A70 (150 mg, 0,485 mmol) trong MeOH (2 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ, sau đó được cô trong chân không trong bể lạnh. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (nạp nguyên liệu khô, silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong

chân không, thu được chất rắn màu trắng nhò, chất này được tinh chế thêm bằng RP HPLC trên C18 Sunfire (30 x 100 5um). Pha động: gradien từ 80% dung dịch TFA 0,1% trong H₂O, 20% CH₃CN đến 0% dung dịch TFA 0,1% trong H₂O, 100% CH₃CN, thu được hợp chất 27 (57 mg, 33%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,84 (br. s, 3 H), 4,79 (br. d, *J*=13,9 Hz, 1 H), 5,02 (br. d, *J*=13,3 Hz, 1 H), 7,10 (t, *J*=54,3 Hz, 1 H), 7,30 (dd, *J*=12,0, 8,8 Hz, 1 H), 7,46 (br. s., 1 H), 7,86 - 7,91 (m, 1 H), 7,93 (dd, *J*=7,5, 2,3 Hz, 1 H), 7,98 (td, *J*=8,7, 2,9 Hz, 1 H), 8,20 (dd, *J*=8,7, 4,6 Hz, 1 H), 8,73 (d, *J*=2,9 Hz, 1 H), 9,33 (br. s., 1 H), 10,07 (br. s., 1 H), 10,80 (br. s, 1 H), 11,09 (br. s., 1 H).

Ví dụ B17

Điều chế hợp chất 28: [3-(4-amino-2-diflometyl-6-metyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-flo-phenyl]-amit của axit (*R*)-5-metoxypyrazin-2-carboxylic

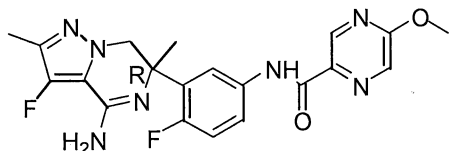


Bổ sung axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (75 mg, 0,485 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (148 mg, 0,533 mmol) trong MeOH (3 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A70 (150 mg, 0,485 mmol) trong MeOH (2 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 4 giờ, sau đó được cô trong chân không trong bể lạnh. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (nạp khô, silica gel; MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không, thu được chất rắn màu trắng nhò, chất rắn này được tinh chế thêm bằng RP HPLC trên C18 Sunfire (30 x 100 5um). Pha động: gradien từ 80% dung dịch TFA 0,1% trong H₂O, 20% CH₃CN đến 0% dung dịch TFA 0,1% trong H₂O, 100% CH₃CN, thu được hợp chất 27 (32 mg, 12%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1,85 (br. s., 3 H) 4,03 (s, 3 H) 4,80 (br. d, *J*=13,9 Hz, 1 H) 5,03 (br. d, *J*=12,7 Hz, 1 H) 7,12 (t, *J*=54,3 Hz, 1 H) 7,31 (dd, *J*=11,8, 9,0 Hz, 1 H) 7,47 (br. s., 1 H) 7,84 - 7,90 (m, 1 H) 7,96

(dd, $J=7,4, 2,2$ Hz, 1 H) 8,42 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H) 8,88 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H) 9,32 (br. s., 1 H) 10,09 (br. s., 1 H) 10,70 (s, 1 H) 11,08 (br. s., 1 H).

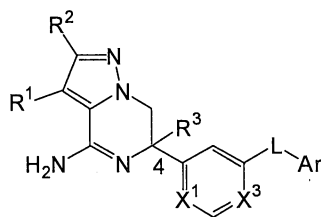
Ví dụ B18

Điều chế hợp chất 29: [3-(4-amino-3-fluoro-2,6-dimethyl-6,7-dihydro-pyrazolo[1,5-a]pyrazin-6-yl)-4-fluorophenyl]-amit của axit (*R*)-5-metoxypyrazin-2-carboxylic

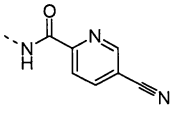
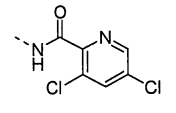
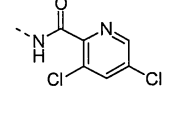
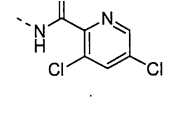
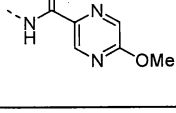
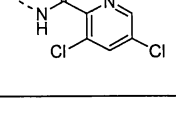
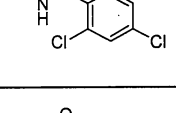
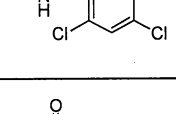
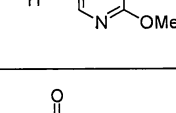
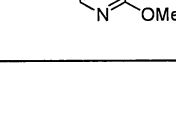


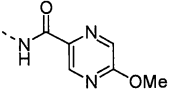
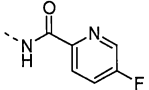
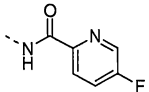
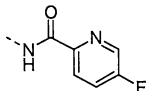
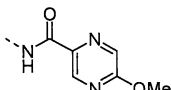
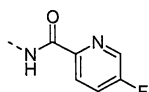
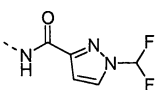
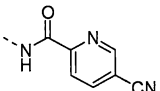
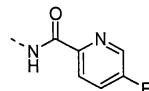
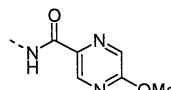
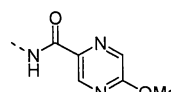
Bổ sung axit 5-metoxypyrazin-2-carboxylic (97 mg, 0,631 mmol) vào hỗn hợp gồm 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (175 mg, 0,631 mmol) trong MeOH (2 mL). Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh xuống 0°C và bổ sung dung dịch chứa hợp chất trung gian A73 (175 mg, 0,601 mmol) trong MeOH (2 mL). Hỗn hợp này được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 24 giờ. Dung môi được loại bỏ trong chân không và phần cặn được tạo huyền phù trong DCM và được xử lý bằng Na_2CO_3 bão hòa. Lớp chất hữu cơ được tách ra, làm khô (MgSO_4), lọc và cô trong chân không. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký cột nhanh (silica gel; NH_3 7M trong MeOH/DCM). Thu gom các phân đoạn mong muốn và dung môi được làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tạo huyền phù trong Et_2O . Chất kết tủa được lọc ra và được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C thu được hợp chất 29 (195 mg, 76%) dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1,45 (br. s, 3 H), 2,12 (s, 3 H), 4,02 (s, 3 H), 4,18 (br. d, $J=13,0$ Hz, 1 H), 4,24 (br. d, $J=12,4$ Hz, 1 H), 6,26 (br. s., 2 H), 7,17 (dd, $J=12,0, 8,8$ Hz, 1 H), 7,68 - 7,77 (m, 1 H), 8,04 (br. d, $J=5,2$ Hz, 1 H), 8,40 (d, $J=1,2$ Hz, 1 H), 8,87 (d, $J=1,2$ Hz, 1 H), 10,46 (br. s, 1 H).

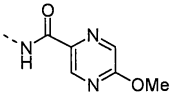
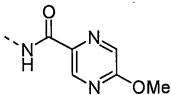
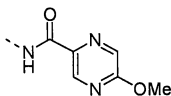
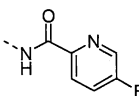
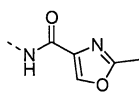
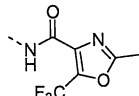
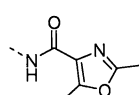
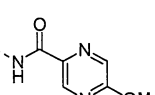
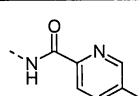
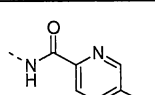
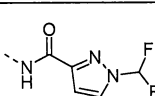
Bảng 1

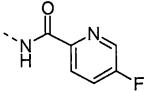
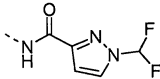
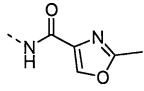


Hợp chất số	Ví dụ số	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ³	---L-Ar	Hóa học lập thể tại C ₄ /muối
1	B1	H	H	CH ₃	CH	CH		R / CF ₃ COOH
2	B2	H	H	CH ₃	CH	CH		RS
3	B3	H	H	CH ₃	CH	CH		RS
4	B4	H	H	CH ₃	CH	CH		S*
5	B4	H	H	CH ₃	CH	CH		R*
6	B5	H	H	CH ₃	CH	CH		RS
7	B5	H	H	CH ₃	CH	CH		R*
8	B5	H	H	CH ₃	CH	CH		S*

Hợp chất số	Ví dụ số	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ³	---L-Ar	Hóa học lập thể tại C ₄ /muối
9	B6	Br	H	CH ₃	CH	CH		RS / CF ₃ COOH
10	B7	H	CF ₃	CH ₃	CH	CH		RS
11	B7	H	CF ₃	CH ₃	CH	CH		R*
12	B7	H	CF ₃	CH ₃	CH	CH		S*
13	B8	F	H	CH ₃	CH	CH		R
14	B9	H	H	CH ₃	CF	CH		RS
15	B9	H	H	CH ₃	CF	CH		R*
16	B9	H	H	CH ₃	CF	CH		S*
17	B10	H	H	CHF ₂	CF	CH		RS
18	B10	H	H	CHF ₂	CF	CH		R*

Hợp chất số	Ví dụ số	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ³	---L-Ar	Hóa học lập thể tại C ₄ /muối
19	B10	H	H	CHF ₂	CF	CH		S*
20	B11	H	H	CHF ₂	CF	CH		RS
21	B11	H	H	CHF ₂	CF	CH		R*
22	B11	H	H	CHF ₂	CF	CH		S*
23	B12	H	CN	CH ₃	CF	CH		R
24	B13	H	CN	CH ₃	CF	CH		R
25	B14	H	CN	CH ₃	CF	CH		R
26	B15	H	CN	CH ₃	CF	CH		R
27	B16	H	CHF ₂	CH ₃	CF	CH		R / CF ₃ COOH
28	B17	H	CHF ₂	CH ₃	CF	CH		R / CF ₃ COOH
29	B18	F	CH ₃	CH ₃	CF	CH		R

Hợp chất số	Ví dụ số	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ³	---L-Ar	Hóa học lập thể tại C ₄ /muối
30	B11	H	CF ₃	CH ₃	CH	CH		RS
31	B11	H	CF ₃	CH ₃	CH	CH		S*
32	B11	H	CF ₃	CH ₃	CH	CH		R*
33	B2	F	H	CH ₃	CF	CH		R
34	B2	F	H	CH ₃	CF	CH		R
35	B2	F	H	CH ₃	CF	CH		R
36	B2	F	H	CH ₃	CF	CH		R
37	B2	Cl	H	CH ₃	CF	CH		R
38	B2	Cl	H	CH ₃	CF	CH		R
39	B16	H	CHF ₂	CH ₃	CF	CH		R
40	B16	H	CHF ₂	CH ₃	CF	CH		R

Hợp chất số	Ví dụ số	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ³	---L-Ar	Hóa học lập thể tại C ₄ /muối
41	B2	F	CH ₃	CH ₃	CF	CH		RS
42	B2	F	CH ₃	CH ₃	CF	CH		R
43	B6	H	CN	CH ₃	CF	CH		R

C. Phân phân tích

Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ ¹H NMR được ghi trên phổ kế Bruker DPX-400 hoặc trên Bruker AV-500 bằng các chuỗi tự xung chuẩn, hoạt động lần lượt ở 400 MHz và 500 MHz. Độ dịch chuyển hóa học (δ) được ghi lại theo phần triệu (ppm) theo trường sau tetrametylsilan (TMS), được sử dụng làm chất chuẩn nội.

Phương pháp LCMS

Để xác định đặc điểm thông qua (LC)MS của các hợp chất theo sáng chế, các phương pháp sau được sử dụng.

Quy trình chung A sử dụng dụng cụ Acquity-SQD

Phép đo UPLC (sắc ký lỏng siêu tính năng) được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống Acquity UPLC (Waters) bao gồm bộ phận sắp xếp mẫu, bơm nhị phân có bộ phận loại khí, lò sấy kiểu bốn cột, bộ dò dây iot (DAD) và cột như được nêu cụ thể trong các phương pháp tương ứng. Bộ dò MS được chế tạo có nguồn ion hóa phun điện tử. Phổ khối được thu trên thiết bị dò SGD bốn cực đơn bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong 0,1 giây sử dụng độ trễ liên kênh là 0,08 giây. Điện áp của kim mao dẫn là 3,0 kV. Điện áp phần nón là 25 V đối với chế độ ion hóa dương và 30 V đối với chế độ ion hóa âm. Nitơ được sử dụng làm khí phun sương. Nhiệt độ nguồn được duy trì ở 140°C. Tiến hành thu thập số liệu bằng phần mềm MassLynx-Openlynx.

Phương pháp 1:

Ngoài quy trình chung A: UPLC pha đảo được thực hiện trên cột BEH-C18 (1,7 μm , 2,1 x 50 mm) từ Waters, với tốc độ dòng bằng 1,0 mL/phút, ở nhiệt độ 50°C không chia tách đi vào bộ dò MS. Các điều kiện gradien được sử dụng là: 95% A (0,5 g/l dung dịch amoni axetat + 5% axetonitril), 5% B (axetonitril), đến 40% A, 60% B trong 3,8 phút, đến 5% A, 95% B trong 4,6 phút, được giữ đến 5,0 phút. Thể tích tiêm 2,0 μl .

Phương pháp 2:

Ngoài quy trình chung A: UPLC pha đảo được thực hiện trên RRHD Eclipse Plus-C18 (1,8 μm , 2,1 x 50 mm) từ Agilent, với tốc độ dòng là 1,0 ml/phút, ở nhiệt độ 50°C không chia tách vào bộ phận phát hiện MS. Các điều kiện gradien được sử dụng là: 95% A (0,5 g/l dung dịch amoni axetat + 5% axetonitril), 5% B (axetonitril), đến 40% A, 60% B trong 1,2 phút, đến 5% A, 95% B trong 1,8 phút, được giữ đến 2,0 phút. Thể tích tiêm 2,0 μl .

Phương pháp 3:

Gradien giống như phương pháp 1; cột được sử dụng: RRHD Eclipse Plus-C18 (1,8 μm , 2,1 x 50 mm) từ Agilent.

Quy trình chung B sử dụng dụng cụ HP 1100-MS (TOF, SQD hoặc MSD)

Phép đo HPLC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống HP 1100 (Agilent Technologies) bao gồm bơm (bơm tứ phân hoặc bơm nhị phân) được lắp bộ phận khử khí, thiết bị lấy mẫu tự động, lò sấy kiểu cột, bộ phận phát hiện dây đi-ôt (DAD) và cột như được mô tả chi tiết trong các phương pháp tương ứng. Bộ phận phát hiện MS (SQD, TOF hoặc MSD) được chế tạo có nguồn ion hóa phun điện tử hoặc nguồn ion hóa kép ESCI (phun điện tử kết hợp với ion hóa hóa học ở khí quyển). Nitơ được dùng làm khí phun sương. Nhiệt độ nguồn được duy trì ở nhiệt độ 140°C hoặc 100°C. Việc thu nhận số liệu được thực hiện bằng phần mềm MassLynx-Openlynx hoặc phần mềm Chemsation-Agilent Data Browser.

B1: Phổ khối được thu nhận trên bộ phận phát hiện MSD bốn cực đơn ở chế độ APCI bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong 0,99 giây, cỡ bước bằng 0,30 và độ rộng

đỉnh bằng 0,10 phút. Điện áp của kim mao dẫn là 3,0 Kv, điện áp bộ phận phân mảnh là 70V đối với chế độ ion hóa dương và âm và cường độ Corona là 4 μ A.

B2: Phổ khối được thu nhận trên thiết bị dò SGD bốn cực đơn bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong 0,1 giây sử dụng độ trễ liên kênh là 0,08 giây. Điện áp của kim mao dẫn là 3,0 kV. Điện áp phần nón là 20 V đối với chế độ ion hóa dương và 30 V đối với chế độ ion hóa âm.

B3: Phổ khối được thu nhận trên thiết bị dò Time of Flight (TOF) bằng cách quét từ 100 đến 750 trong 0,5 giây sử dụng thời gian dừng bằng 0,3 giây. Điện áp của kim mao dẫn là 2,5 kV đối với chế độ ion hóa dương và 2,9 kV đối với chế độ ion hóa âm. Điện áp phần nón là 20 V đối với cả kiểu ion hóa dương và âm. Loxin-Enkephalin là chất chuẩn được sử dụng để hiệu chuẩn khối lượng ăn khớp.

Phương pháp 4:

Ngoài quy trình chung B1: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Eclipse Plus-C18 (3,5 μ m, 2,1 x 30 mm) từ Agilent, với tốc độ dòng là 1,0 ml/phút, ở nhiệt độ 60°C. Các điều kiện gradien được sử dụng là: 95% A (6,5 mM NH_4AcO trong $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 95/5), 5% B (ACN), được giữ 0,2 phút, đến 100% B trong 3,0 phút, được giữ đến 3,15 phút và được làm cân bằng đến các điều kiện ban đầu từ 3,3 phút đến 5,0 phút. Thể tích tiêm 2 μ l.

Phương pháp 5:

Ngoài quy trình chung B2: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Eclipse Plus-C18 (3,5 μ m, 2,1 x 30 mm) từ Agilent, với tốc độ dòng là 1,0 ml/phút, ở nhiệt độ 60°C. Các điều kiện gradien được sử dụng là: 95% A (6,5 mM NH_4AcO trong $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 95/5), 5% B (ACN/ MeOH 1/1), đến 100% B trong 5,0 phút, được giữ đến 5,15 phút và được làm cân bằng đến các điều kiện ban đầu từ 5,30 phút đến 7,0 phút. Thể tích tiêm là 2 μ l.

Phương pháp 6:

Ngoài quy trình chung B3: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Eclipse Plus-C18 (3,5 μ m, 2,1 x 30 mm) từ Agilent, với tốc độ dòng là 1,0 ml/phút, ở nhiệt độ 60°C. Các điều kiện gradien được sử dụng là: 95% A (6,5 mM NH_4AcO trong $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 95/5), 5% B (ACN), được giữ 0,2 phút, đến 100% B trong 3,0 phút, được giữ đến 3,15 phút và được làm cân bằng đến các điều kiện ban đầu từ 3,3 phút cho đến 5,0 phút. Thể tích tiêm là 2 μ l.

Quy trình chung C:

Phép đo HPLC được thực hiện bằng cách sử dụng môđun Agilent 1100 bao gồm bơm, bộ phận phát hiện dãy đi-ô (DAD) (bước sóng được sử dụng 220 nm), bộ phận làm nóng cột và cột như được chỉ rõ trong các phương pháp tương ứng dưới đây. Dòng đi ra từ cột được chia tách tới Agilent MSD Series G1946C và G1956A. Bộ phận phát hiện MS được chế tạo có API-ES (ion hóa phun điện tử ở áp suất khí quyển). Phổ khối được thu nhận bằng cách quét từ 100 đến 1000. Điện áp của kim mao dẫn là 2500 V đối với chế độ ion hóa dương và 3000 V đối với chế độ ion hóa âm. Điện áp bộ phận phân mảnh là 50 V. Nhiệt độ khí làm khô được duy trì ở 350°C với lưu lượng là 10 l/phút.

Phương pháp 7:

Ngoài quy trình chung C: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột YMC-Pack ODS-AQ, 50x2,0 mm 5 μ m với tốc độ dòng là 0,8 ml/phút. Hai pha động (pha động A: H₂O với 0,1% TFA; pha động B: CAN với 0,05% TFA) được sử dụng. Trước tiên, 100% A được giữ trong 1 phút. Sau đó, áp dụng gradien 40% A và 60% B trong 4 phút và được giữ trong 2,5 phút. Thể tích tiêm thường bằng 2 μ l được sử dụng. Nhiệt độ lò là 50°C. (Độ phân cực MS: dương).

Phương pháp 8:

Ngoài quy trình chung C: HPLC pha đảo được thực hiện trên cột Ultimate XB-C18, 50x2,1 mm 5 μ m với tốc độ dòng là 0,8 ml/phút. Hai pha động (pha động C: 10 mmol/L NH₄HCO₃; pha động D: ACN) được sử dụng. Trước tiên, 100% C được giữ trong 1 phút. Sau đó, áp dụng gradien 40% C và 60% D trong 4 phút và được giữ trong 2,5 phút. Thể tích tiêm thường bằng 2 μ l được sử dụng. Nhiệt độ lò là 50°C. (Độ phân cực MS: dương).

Quy trình chung D

Phép đo UHPLC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống Shimadzu 2010 LCMS bao gồm bơm, bộ dò tia diot quang (PDA) (bước sóng được sử dụng 220 nm), lò sấy kiểu cột và cột như được nêu rõ trong các phương pháp tương ứng dưới đây. Dòng đi ra từ cột được phân chia tới thiết bị dò Shimadzu 2010 MSD. Bộ phận phát hiện MS được chế tạo có API-ES (ion hóa phun điện tử ở áp suất khí quyển). Phổ khối được thu nhận bằng cách quét từ 100 đến 1000. Điện áp giữa hai mặt là 4500 V đối với chế độ ion

hóa dương. Tốc độ dòng khí phun sương là 1,5 l/phút. Nhiệt độ CDL (Đường khử solvat hóa cong với ống mao dẫn được gia nhiệt) là 250°C và điện áp CDL là 30 V. Nhiệt độ khối nhiệt là 200°C. Điện áp của thiết bị dò là 1500 V.

Phương pháp 9

Ngoài quy trình chung D: UHPLC pha đảo được thực hiện trên cột Xtimate C18 (30× 2,1mm 3,0μm) với tốc độ dòng là 1,2 mL/phút. Hai pha động (A: H₂O với TFA 0,15%; B: ACN với TFA 0,75%) được sử dụng. Trước tiên, 100% A được giữ trong 1 phút. Sau đó, áp dụng gradien 40% A và 60% B trong 0,9 phút, được giữ 1,5 phút và được làm cân bằng đến các điều kiện ban đầu từ 1,51 phút đến 2,0 phút. Thể tích tiêm thường bằng 1,0 μL được sử dụng. Nhiệt độ lò là 50°C. (Độ phân cực MS: dương).

Quy trình chung E

Phép đo LC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Acquity (Waters) bao gồm bơm nhị phân có bộ phận khử khí, thiết bị lấy mẫu tự động, bộ phận phát hiện dãy đi-ôt (DAD) và cột như được nêu rõ trong các phương pháp tương ứng dưới đây, cột được giữ ở nhiệt độ bằng 40°C. Dòng chảy từ cột được đưa đến bộ phận phát hiện MS. Bộ phận phát hiện MS được chế tạo có nguồn ion hóa phun điện tử. Phổ khối được thu nhận trên thiết bị dò phổ khối ba tứ cực Quattro (Waters) bằng cách quét từ 100 đến 1000 trong 0,2 giây sử dụng độ trễ quét giữa bằng 0,1 giây. Điện áp của kim mao dẫn là 3 kV và nhiệt độ nguồn được duy trì ở 130°C. Điện thế hình nón là 20V đối với chế độ ion hóa dương và âm. Nitơ được dùng làm khí phun sương. Việc thu nhận số liệu được thực hiện bằng phần mềm MassLynx-Openlynx (Waters).

Phương pháp 10:

Ngoài quy trình chung E: UPLC pha đảo được thực hiện trên cột Waters Acquity BEH (hỗn hợp etylsiloxan có cầu/silic oxit) Phenyl-Hexyl (1,7 μm, 2,1 x 100 mm) với tốc độ dòng là 0,343 ml/phút. Hai pha động (pha động A: 95% 7 mM NH₄AcO / 5% ACN; pha động B: 100%ACN) được sử dụng để tiến hành điều kiện gradien 84,2% A và 15,8% B (được giữ trong 0,49 phút) đến 10,5% A và 89,5% B trong 2,18 phút, được giữ trong 1,94 phút và trở về các điều kiện ban đầu trong 0,73 phút, được giữ trong 0,73 phút. Sử dụng thể tích tiêm bằng 2 ml.

Điểm nóng chảy

Các giá trị là giá trị đỉnh hoặc khoảng nóng chảy, và thu được với độ không chắc chắn của thử nghiệm mà thường có liên quan đến phương pháp phân tích này.

Thiết bị Mettler FP 81HT/FP90 – FP62 (được biểu thị bằng FP90 và FP62 trong bảng 2)

Đối với một số hợp chất, điểm nóng chảy được xác định trong các ống mao dẫn hở trên thiết bị Mettler FP62 hoặc Mettler FP81HT/FP90. Điểm nóng chảy được xác định với gradien nhiệt độ bằng 1, 3, 5 hoặc 10°C/phút. Nhiệt độ tối đa là 300°C. Điểm nóng chảy được đọc từ màn hình số.

Bảng 2: Số liệu phân tích – R_t có nghĩa là thời gian lưu (tính bằng phút), $[M+H]^+$ có nghĩa là khối lượng được proton hóa của hợp chất, phương pháp chỉ phương pháp được sử dụng cho (LC)MS.

Hợp chất số	R_t	$[M+H]^+$	Phương pháp	Điểm nóng chảy
1	1,55	338	3	n.d.
2	1,6	381	3	n.d.
3	1,58	415	3	94,4°C (FP62)
4	2,25	415	10	212,2°C (FP62)
5	2,25	415	10	186,3°C (FP62)
6	1,18	372	3	221,6°C (FP62)
7	1,98	372	10	281,8°C (FP62)
8	1,99	372	10	248,8°C (FP62)
9	1,98	450	3	147,4°C (FP62)
10	3,60	483	5	>300°C (FP90)
11	2,90	483	10	147,8°C (FP62)

Hợp chất số	R _t	[M+H] ⁺	Phương pháp	Điểm nóng chảy
12	2,90	483	10	221,8°C (FP62)
13	0,97	414	2	99,4°C (FP90)
14	1,74	433	3	n.d.
15	2,37	433	10	>300°C (FP90)
16	2,37	433	10	>300°C (FP90)
17	1,90	432	3	263,4°C (FP90)
18	2,45	432	10	248°C (FP90)
19	2,45	432	10	279,9°C (FP90)
20	1,94	419	3	236,9°C (FP90)
21	2,48	419	10	n.d.
22	2,49	419	10	220,4°C (FP90)
23	2,26	421	3	276,3°C (FP90)
24	2,29	408	3	186,4°C (FP90)
25	2,23	433	3	180°C (FP90)
26	2,18	446	3	n.d.
27	2,14	428	3	n.d.
28	2,18	429	3	n.d.
29	2,25	415	3	>300°C (FP90)
30	3,31	446	5	n.d.

Hợp chất số	R _t	[M+H] ⁺	Phương pháp	Điểm nóng chảy
31	2,72	446	10	220,9°C (FP62)
32	2,72	446	10	220°C (FP62)
33	0,99	401	2	186°C (FP90)
34	1,47	387	3	187°C (FP62)
35	3,24	455	5	87,2°C (FP62)
36	2,75	401	5	109,8°C (FP62)
37	2,24	430	3	108,8°C (FP90)
38	2,32	417	3	>300°C (FP90)
39	2,53	449	3	n.d.
40	2,04	454	3	n.d.
41	2,18	415	3	n.d.
42	1,94	436	3	n.d.
43	1,86	394	3	n.d.

n.d. có nghĩa là không được xác định

Phương pháp SFCMS

Quy trình chung A đối với phương pháp SFC-MS

Phép đo SFC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống SFC phân tích từ Berger Instruments (Newark, DE, USA) bao gồm môđun điều khiển bơm nhị phân (FCM-1200) để phân phối cacbon dioxit (CO₂) và tác nhân cải biến, môđun kiểm soát nhiệt để gia nhiệt cột (TCM2100) đồng thời kiểm soát nhiệt độ trong khoảng 1-150°C và van chọn lựa cột (Valco, VICI, Houston, TX, USA) cho sáu cột khác nhau. Bộ dò dây diot quang (Agilent 1100, Waldbronn, Đức) được lắp cuvet đo dòng chảy áp lực cao (lên đến 400 bar) và được chế tạo có thiết bị lấy mẫu tự động CTC LC Mini PAL (Leap Technologies,

Carrboro, NC, USA). Khối phổ kế ZQ (Waters, Milford, MA, USA) có giao diện phun điện tử Z vuông góc được nối với hệ thống SFC. Việc điều khiển thiết bị, thu và xử lý số liệu được thực hiện bằng nền tảng tích hợp gồm phần mềm SFC ProNT0 và phần mềm Masslynx.

Phương pháp 1

Ngoài quy trình chung A: Sự phân tách các chất không đối xứng trong SFC được thực hiện trên cột CHIRALPAK AD-H (4,6 mm x 500 mm) ở nhiệt độ 50°C với tốc độ dòng là 3,0 ml/phút. Pha động là CO₂, 20% MeOH (chứa 0,2% iPrNH₂) được giữ trong 15,00 phút, chế độ đẳng dòng.

Quy trình chung B

Việc đo SFC được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống SFC phân tích từ nhà cung cấp thiết bị Berger (Newark, DE, USA) bao gồm môđun theo dõi chất lỏng bơm nhị phân FCM-1200 để phân phối cacbon dioxit (CO₂) và tác nhân cải biến, thiết bị lấy mẫu chất lỏng tự động CTC Analytics, môđun theo dõi nhiệt TCM-20000 để gia nhiệt cột từ nhiệt độ trong phòng đến 80°C. Bộ dò mảng diot quang Agilent 1100 UV được lắp ngăn dòng chảy áp lực cao chịu áp đến 400 bar được sử dụng. Dòng ra từ cột được chia tách tới phổ kế MS. Bộ phận phát hiện MS được kết cấu có nguồn ion hóa ở áp suất khí quyển. Các thông số ion hóa sau đối với khối phổ quang kế Waters ZQ là: điện hoa: 9μa, nhiệt độ nguồn: 140°C, điện áp phần nóng: 30 V, nhiệt độ đầu dò 450°C, thiết bị chiết 3 V, khí khử solvat 400L/giờ, khí dạng hình nón 70 L/giờ. Nitơ được dùng làm khí phun sương. Việc thu nhận số liệu được thực hiện bằng hệ thống lấy số liệu Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

Phương pháp 2

Ngoài quy trình chung B: Sự phân tách các chất không đối xứng trong SFC được thực hiện trên cột CHIRALPAK AD DAICEL (10 μm, 4,6 x 250 mm) ở nhiệt độ 35°C với lưu lượng dòng chảy là 3,0 ml/phút. Pha động là CO₂, 60% etanol, 40% EtOH (chứa 0,3% iPrNH₂) được giữ 7 phút.

Bảng 3: Số liệu SFC phân tích – R_t có nghĩa là thời gian lưu (tính bằng phút), $[M+H]^+$ có nghĩa là khối lượng được proton hóa của hợp chất, phương pháp dùng để chỉ phương pháp được sử dụng để phân tích SFC/MS của các hợp chất tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh.

Hợp chất số	R_t	$[M+H]^+$	Diện tích UV%	Phương pháp	Thứ tự rửa giải chất đồng phân*	Lượng dư chất đồng phân đối ảnh (%)
Hợp chất trung gian A6(S)	5,35	230	100	1	A	-
Hợp chất trung gian A6(R)	6,88	230	100	1	B	-
4	3,17	415	100	2	A	-
5	4,17	415	100	2	B	-
7	1,92	372	100	2	A	-
8	3,05	372	100	2	B	-
11	4,95	483	100	3	B	-
12	4,01	483	100	3	A	-
15	4,14	433	100	4	A	-
16	5,17	433	100	4	B	-
18	3,07	432	100	5	A	-
19	4,15	432	100	5	B	-

Hợp chất số	R _t	[M+H] ⁺	Diện tích UV%	Phương pháp	Thứ tự rửa giải chất đồng phân*	Lượng dư chất đồng phân đối ảnh (%)
21	2,81	419	100	3	A	-
22	4,17	419	100	3	B	-
27	4,37	433	89,33	6	A	79
28	4,97	446	70,11	7	A	40
31	3,33	446	100	3	A	-
32	3,90	446	99,44	3	B	-
39	5,20	449	91,51	6	A	83
40	3,40	454	93,61	7	A	88

*A có nghĩa là chất đồng phân rửa giải thứ nhất. B có nghĩa là chất đồng phân rửa giải thứ hai. Lượng dư chất đồng phân đối ảnh được đánh giá trong trường hợp các hợp chất không tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh.

Độ quay quang:

Độ quay quang được xác định trên phân cực kế Perkin-Elmer 341 với đèn natri và được thể hiện như sau: $[\alpha]_{\lambda}^{t^{\circ}\text{C}}$ (c g/100 ml, dung môi).

Bảng 4: Số liệu phân tích – Các giá trị về độ quay quang đối với các hợp chất tinh khiết về mặt đồng phân đối ảnh

Hợp chất số	α_D (°)	Bước sóng (nm)	Nồng độ % khối lượng/thể tích	Dung môi	Nhiệt độ (°C)
4	+20,3	589	0,56	DMF	20
5	-31,6	589	0,5	DMF	20

Hợp chất số	α_D (°)	Bước sóng (nm)	Nồng độ % khối lượng/thể tích	Dung môi	Nhiệt độ (°C)
7	-70,7	589	0,45	DMF	20
8	+45,6	589	0,41	DMF	20
11	12,0	589	0,50	MeOH	20
12	-18,8	589	0,50	MeOH	20
13	83,7	589	0,55	DMF	20
18	136,8	589	0,51	DMF	20
19	-140,8	589	0,50	DMF	20
21	-126,7	589	0,51	DMF	20
22	115,2	589	0,54	DMF	20
23	144,4	589	0,50	DMF	20
24	111,4	589	0,51	DMF	20
25	121,1	589	0,50	DMF	20
29	111,0	589	0,51	DMF	20
31	17,9	589	0,50	MeOH	20
32	-26,4	589	0,50	MeOH	20
33	56,6	589	0,65	DMF	20
35	81,5	589	0,50	DMF	20
37	29,2	589	0,52	DMF	20
38	14,8	589	0,49	DMF	20

Hợp chất số	α_D (°)	Bước sóng (nm)	Nồng độ % khối lượng/thể tích	Dung môi	Nhiệt độ (°C)
41	65,2	589	0,50	DMF	20
42	77,1	589	0,50	DMF	20

n.d. có nghĩa là không được xác định

Ví dụ được lý

Hợp chất được đề xuất trong sáng chế là các chất ức chế enzym phân cắt APP vị trí β 1 (BACE1). Sự ức chế BACE1, một aspartic proteaza, được tin có lợi ích điều trị bệnh Alzheimer (AD). Quá trình sản xuất và tích lũy các peptit dạng β -amyloid ($A\beta$) từ protein tiền chất dạng β -amyloid (APP) được tin là đóng vai trò quan trọng trong việc khởi phát và tiến triển của AD. $A\beta$ được sản xuất từ protein tiền chất dạng amyloid (APP) bởi việc phân cắt liên tiếp ở các đầu tận cùng N và C của miền $A\beta$ lần lượt bằng β -secretaza và γ -secretaza.

Hợp chất có công thức (I) được mong đợi là có tác dụng chủ yếu ở BACE1 nhờ khả năng ức chế hoạt tính enzym của chúng. Tập tính của các chất ức chế này được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm dựa trên sự chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang hóa sinh (Biochemical fluorescence resonance energy transfer: FRET) và thử nghiệm α lisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 được mô tả dưới đây và thích hợp để nhận diện các hợp chất này, và cụ thể hơn, các hợp chất có công thức (I), được thể hiện trong bảng 3.

Thử nghiệm dựa trên FRET hóa sinh

Thử nghiệm này là thử nghiệm dựa trên sự truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET). Cơ chất cho thử nghiệm này là peptit gồm 13 axit amin có nguồn gốc từ APP chứa đột biến Lys-Met/Asn-Leu 'Swedish' của vị trí phân cắt β -secretaza protein tiền chất dạng amyloid (APP). Cơ chất này cũng chứa hai chất huỳnh quang: axit (7-metoxycoumarin-4-yl) axetic (Mca) là chất cho phát huỳnh quang với bước sóng kích thích ở 320 nm và bước sóng phát xạ ở 405 nm và 2,4-Dinitrophenyl (Dnp) là chất nhận làm tắt ánh sáng huỳnh quang. Khoảng cách giữa hai nhóm được chọn sao cho trong quá trình kích thích bởi ánh sáng, năng lượng huỳnh quang của chất cho bị hấp thu đáng kể

bởi chất nhận, thông qua quá trình chuyển năng lượng cộng hưởng. Khi phân cắt bằng BACE1, Mca phát huỳnh quang được tách riêng khỏi nhóm hấp phụ Dnp, khôi phục tổng hiệu suất phát huỳnh quang của chất nhận. Mức tăng phát huỳnh quang tỷ lệ thuận với tốc độ phân giải protein (Koiike H *et al. J. Biochem.* 1999, 126, 235-242).

Nói một cách ngắn gọn, trong dạng có 384 lỗ, protein BACE1 tái tổ hợp với nồng độ cuối cùng bằng 1 µg/ml được ủ trong 120 phút ở nhiệt độ trong phòng với 10 µM cơ chất trong đệm ủ (đệm xitrat nồng độ 40mM, độ pH=5,0, PEG 0,04%, DMSO 4%) khi không có mặt hoặc có mặt hợp chất. Tiếp theo, lượng sản phẩm phân giải protein được xác định trực tiếp bằng phép đo mức phát huỳnh quang ở T=0 và T=120 (bước sóng kích thích ở 320 nm và bước sóng phát xạ ở 405 nm). Các kết quả được biểu thị bằng RFU, dưới dạng mức chênh lệch giữa T120 và T0.

Đường cong phù hợp nhất được hiệu chỉnh phương pháp tổng bình phương nhỏ nhất về đồ thị của % mức thấp nhất theo nồng độ hợp chất. Từ đường cong này, có thể thu được giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế gây ức chế 50% hoạt tính).

LC = Trung bình của giá trị mức thấp

= Mức thấp: Phản ứng không có enzym

HC = Trung bình của giá trị mức cao

= Mức cao: Phản ứng có enzym

% hiệu quả = $100 - [(mẫu - LC) / (HC - LC) * 100]$

% Kiểm soát = $(mẫu / HC) * 100$

% Kiểm soát nhỏ nhất = $(mẫu - LC) / (HC - LC) * 100$

Các hợp chất được nêu làm ví dụ sau đây được thử nghiệm về cơ bản như nêu trên và thể hiện hoạt tính sau đây:

Bảng 5

Hợp chất số	Thử nghiệm dựa trên FRET hóa sinh pIC ₅₀
1	6,28
2	7,08
3	7,33
4	4,67
5	7,43
6	7,25
7	7,75
8	4,86
9	5,1
10	7,2
11	7,55
12	5,06
13	7,14
14	7,45
15	7,73
16	5,98
17	7,24
18	7,65

Hợp chất số	Thử nghiệm dựa trên FRET hóa sinh pIC ₅₀
19	5,01
20	7,18
21	<4,52
22	7,59
23	7,4
24	7,49
25	7,56
26	7,31
27	7,22
28	7,16
29	7,09
30	6,77
31	4,97
32	7,20
33	7,19
34	7,23
35	6,91
36	7,04
37	5,86

Hợp chất số	Thử nghiệm dựa trên FRET hóa sinh pIC ₅₀
38	6,03
39	7,39
40	7,28
41	6,93
42	7,12
43	7,53

Thử nghiệm α Lisa tế bào ở các tế bào SKNBE2

Trong hai thử nghiệm α lisa, mức A β tổng và A β 42 được sản xuất và được tiết vào môi trường nuôi cấy các tế bào SKNBE2 u nguyên bào thần kinh ở người được định lượng. Thử nghiệm này dựa trên u nguyên bào thần kinh ở người SKNBE2 biểu hiện protein tiền chất dạng amyloid kiểu đại (hAPP695). Các hợp chất được pha loãng và được bổ sung vào các tế bào này, được ủ trong 18 giờ và sau đó tiến hành đo lượng A β 42 và A β tổng. A β tổng và A β 42 được xác định bằng thử nghiệm α Lisa “bánh kẹp”. α Lisa là thử nghiệm “bánh kẹp” sử dụng kháng thể được biotin hóa AbN/25 gắn vào các hạt phủ streptavidin và kháng thể Ab4G8 hoặc cAb42/26 được liên hợp với các hạt nhận để phát hiện Abeta tổng và A β 42, tương ứng. Trong điều kiện có mặt Abeta tổng hoặc A β 42, các hạt tiếp xúc gần. Sự kích thích của các hạt cho làm giải phóng phân tử oxy đơn mà khởi động thác truyền năng lượng trong các hạt nhận, tạo ra sự phát xạ ánh sáng. Mức phát xạ ánh sáng được đo sau khi ủ 1 giờ (bước sóng kích thích ở 650 nm và bước sóng phát xạ ở 615 nm).

Đường cong phù hợp nhất được hiệu chỉnh theo phương pháp tổng bình thường nhỏ nhất về đồ thị của % mức thấp nhất theo nồng độ hợp chất. Từ đường cong này, có thể thu được giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế gây ức chế 50% hoạt tính).

LC = Trung bình của giá trị mức thấp

= Mức thấp: Các tế bào được ủ sơ bộ không có hợp chất, không có Ab

được bitotin hóa trong α lisa

HC = Trung bình của giá trị mức cao

= Mức cao: các tế bào được ủ sơ bộ không có hợp chất

$$\% \text{ Tác dụng} = 100 - [(\text{mẫu-LC}) / (\text{HC-LC}) * 100]$$

$$\% \text{ Kiểm soát} = (\text{mẫu} / \text{HC}) * 100$$

$$\% \text{ Kiểm soát nhỏ nhất} = (\text{mẫu-LC}) / (\text{HC-LC}) * 100$$

Các hợp chất được nêu làm ví dụ sau đây được thử nghiệm chủ yếu như nêu trên và thể hiện hoạt tính sau đây:

Bảng 6

Hợp chất số	Thử nghiệm α lisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 A β 42 pIC ₅₀	Thử nghiệm α lisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 A β tổng pIC ₅₀
1	7,03	7
2	8,49	8,61
3	8,49	8,47
4	5,84	5,84
5	8,59	8,55
6	8,24	8,29
7	8,66	8,69
8	6,13	6,13
9	6,00	6,06
10	7,78	7,81

Hợp chất số	Thử nghiệm α lisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 $A\beta_{42}$ pIC_{50}	Thử nghiệm α lisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 $A\beta$ tổng pIC_{50}
11	7,94	8,01
12	5,64	5,75
13	8,17	8,26
14	8,87	8,93
15	9,33	9,37
16	7,66	7,74
17	7,40	7,48
18	7,52	7,54
19	5,28	5,13
20	7,07	7,18
21	<5	<5
22	7,17	7,21
23	8,75	8,71
24	8,48	8,41
25	8,88	8,87
26	8,83	8,84
27	8,15	8,17

Hợp chất số	Thử nghiệm α alisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 $A\beta_{42}$ pIC_{50}	Thử nghiệm α alisa tế bào ở các tế bào SKNBE2 $A\beta$ tổng pIC_{50}
28	8,28	8,20
29	7,79	7,77
30	7,43	7,45
31	5,58	5,61
32	7,76	7,84
33	8,09	8,14
34	7,83	7,78
35	7,33	7,30
36	7,56	7,53
37	6,03	6,07
38	6,16	6,22
39	8,61	8,59
40	8,42	8,37
41	7,69	7,67
42	8,02	7,99
43	8,72	8,70

n.t. có nghĩa là không được thử nghiệmHoạt lực được thể hiện in vivo

Chất làm giảm A β peptit theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh AD ở các động vật có vú như người hoặc theo cách khác thể hiện hoạt lực ở các động vật thử nghiệm như, nhưng không chỉ hạn chế ở, chuột nhắt, chuột cống, hoặc chuột lang. Động vật có vú có thể không được chẩn đoán mắc bệnh AD, hoặc có thể không có xu hướng di truyền mắc bệnh AD, nhưng có thể là động vật chuyển gen, vì vậy nó sản xuất quá mức và cuối cùng chất lắng đọng A β theo cách tương tự với cách được thấy ở người bị mắc bệnh AD.

Chất làm giảm A β peptit có thể được sử dụng ở dạng tiêu chuẩn bất kỳ sử dụng phương pháp chuẩn bất kỳ. Ví dụ nhưng không chỉ giới hạn ở, chất làm giảm A β peptit có thể ở dạng chất lỏng, viên nén hoặc viên nang và được dùng qua đường miệng hoặc bằng cách tiêm. Chất làm giảm A β peptit có thể được sử dụng ở liều bất kỳ mà đủ để làm giảm đáng kể mức A β peptit trong máu, huyết tương của máu, huyết thanh, dịch não tủy (CSF), hoặc não.

Để xác định xem việc sử dụng ngay chất làm giảm A β 42 peptit có làm giảm mức A β peptit in vivo hay không, sử dụng loài gặm nhấm không chuyển gen, ví dụ chuột nhắt hoặc chuột cống. Các con chuột này đã dùng chất làm giảm A β peptit được kiểm tra và được so sánh với các động vật không dùng hoặc dùng tá dược lỏng và mức A β 42 hòa tan và A β tổng trong não được định lượng bằng các kỹ thuật chuẩn, ví dụ, sử dụng ELISA. Khoảng thời gian dùng các chất nêu trên thay đổi từ vài giờ (h) đến vài ngày và được điều chỉnh dựa trên các kết quả làm giảm A β 42 ngay tại thời điểm bắt đầu có tác dụng.

Quy trình điển hình để xác định hiệu quả làm giảm A β 42 in vivo được nêu chỉ là một trong số nhiều quy trình có thể được sử dụng để tối ưu hóa mức A β phát hiện được. Ví dụ, hợp chất làm giảm A β peptit được phối chế trong 20% hydroxypropyl β xyclodextrin. Chất làm giảm A β peptit được cho dùng dưới dạng một liều dùng qua đường miệng (p.o.) hoặc một liều dùng dưới da (s.c.) cho động vật được để nhịn đói qua đêm. Sau một thời gian nhất định, thường là 2 hoặc 4 giờ (như được thể hiện trong bảng 7), các động vật có vú bị giết và mức A β 42 được phân tích.

Máu được thu gom bằng cách chặt đầu và hút hết máu vào ống thu gom đã được xử lý bằng EDTA. Máu này được ly tâm ở tốc độ 19000m/giây² trong 10 phút (min) ở nhiệt độ 4°C và huyết tương được thu hồi và được làm đông lạnh nhanh để phân tích sau này. Não được lấy ra từ sọ và não sau. Tiểu não được lấy ra và bán cầu trái và phải được

tách riêng ra. Bán cầu trái được bảo quản ở nhiệt độ -18°C để định mức hợp chất thử nghiệm. Bán cầu phải được rửa bằng nước muối đệm phosphat (PBS) và được làm đông lạnh ngay trên đá khô và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi đông hóa để dùng cho các thử nghiệm hóa sinh.

Não chuột nhất lấy từ chuột không chuyển gen được tái tạo huyền phù trong 8 thể tích của DEA0,4% (dietylamin) / NaCl 50 mM chứa chất ức chế proteaza (Roche-11873580001 hoặc 04693159001) tính theo mỗi gam mô, ví dụ trong 0,158 g não, bổ sung 1,264 ml DEA 0,4%. Tất cả các mẫu đều được đông hóa trong hệ FastPrep-24 (MP Biomedicals) sử dụng chất nền làm tan D (MPBio #6913-100) ở 6m/giây trong 20 giây. Các dịch đồng hóa được ly tâm ở 2213000 m/giây^2 trong 50 phút. Sau đó, các dịch nổi bề mặt thu được khi ly tâm ở tốc độ cao được chuyển đến các ống eppendorf mới. Chín phần dịch nổi bề mặt này được trung hòa bằng 1 phần Tris-HCl 0,5 M, độ pH=6,8 và được sử dụng để định lượng A β tổng và A β 42.

Để xác định lượng A β tổng và A β 42 trong phân đoạn tan của các dịch đồng hóa não, sử dụng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym. Nói một cách ngắn gọn, các chất chuẩn (dịch pha loãng A β 1-40 và A β 1-42 tổng hợp, Bachem) được phối chế trong ống Eppendorf dung tích 1,5 ml trong Ultraculture, với các nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10000 đến 0,3 pg/ml. Các mẫu và các chất chuẩn được ủ đồng thời với kháng thể có đầu tận cùng N được gắn nhãn HRPO để phát hiện A β 42 và với kháng thể có miền giữa được biotin hóa 4G8 để phát hiện A β tổng. 50 μl hỗn hợp gồm thể tiếp hợp/mẫu hoặc thể tiếp hợp/các chất chuẩn sau đó được bổ sung vào đĩa phủ kháng thể (kháng thể bắt giữ nhận diện chọn lọc đầu tận C của A β 42, kháng thể JRF/cA β 42/26, để phát hiện A β 42 và đầu tận cùng N của A β , kháng thể JRF/rA β /2, để phát hiện A β tổng). Đĩa này được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C để hình thành phức kháng thể-dạng amyloid. Sau bước ủ này và các bước rửa tiếp theo thử nghiệm ELISA để định lượng A β 42 được kết thúc bằng cách bổ sung cơ chất peroxidaza sinh huỳnh quang Quanta Blu theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Pierce Corp., Rockford, IL). Việc đọc được thực hiện sau từ 10 đến 15 phút (bước sóng kích thích 320 nm /bước sóng phát xạ 420 nm).

Để phát hiện A β tổng, thể tiếp hợp Streptavidin-Peroxidaza được bổ sung, sau 60 phút tiến hành bước rửa bổ sung và bổ sung cơ chất peroxidaza sinh huỳnh quang Quanta Blu theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Pierce Corp., Rockford, IL). Việc đọc được thực hiện sau 10 đến 15 phút (bước sóng kích thích 320 nm /bước sóng phát xạ 420 nm).

Trong mô hình thử nghiệm này, mức làm giảm ít nhất 20% A β 42 so với động vật không được xử lý sẽ đem lại lợi ích.

Các hợp chất ví dụ sau được thử nghiệm về cơ bản như nêu trên và thể hiện hoạt tính sau:

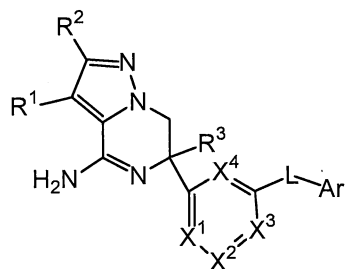
Bảng 7:

Hợp chất số	A β 42 (%Ctrl)_trung bình	A β tổng (%Ctrl)_trung bình	Liều dùng	Đường dùng	Thời gian sau khi dùng
7	88	101	30 mg/kg	p.o.	4 giờ
11	89	84	30 mg/kg	p.o.	4 giờ
23	45	39	10 mg/kg	p.o.	4 giờ
24	16	31	30 mg/kg	p.o.	4 giờ
24	66	59	5 mg/kg	p.o.	4 giờ
27	55	61	10 mg/kg	p.o.	4 giờ
28	39	50	10 mg/kg	p.o.	4 giờ
29	59	58	10 mg/kg	p.o.	4 giờ
32	53	58	30 mg/kg	p.o.	2 giờ
33	49	20	100 mg/kg	s.c.	4 giờ

n.t. có nghĩa là không được thử nghiệm; s.c. có nghĩa là dưới da; p.o. có nghĩa là qua đường miệng

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



hoặc tautome hoặc dạng đồng phân lập thể của nó, trong đó:

R^1 và R^2 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halo, xyano, C_{1-3} alkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl hoặc C_{3-6} xycloalkyl;

R^3 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C_{1-3} alkyl, C_{3-6} xycloalkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl, homoaryl và heteroaryl;

X^1 , X^2 , X^3 , X^4 độc lập là $C(R^4)$ hoặc N, với điều kiện là không quá hai trong số các nhóm này là N; mỗi nhóm R^4 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halo, C_{1-3} alkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl, xyano, C_{1-3} alkyloxy, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy;

L là một liên kết hoặc $-N(R^5)CO-$, trong đó R^5 là hydro hoặc C_{1-3} alkyl;

Ar là homoaryl hoặc heteroaryl;

trong đó homoaryl là phenyl hoặc phenyl được thế bằng một, hai hoặc ba phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkyloxy, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy;

heteroaryl được chọn từ nhóm bao gồm pyridyl, pyrimidyl, pyrazyl, pyridazyl, furanyl, thienyl, pyrrolyl, pyrazolyl, imidazolyl, triazolyl, thiazolyl, thiadiazolyl, oxazolyl, và oxadiazolyl, mỗi nhóm tùy ý được thế bằng một, hai hoặc ba phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkyloxy, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyl, mono- và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy; hoặc muối cộng hoặc solvat của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 và R^2 độc lập được chọn từ hydro và C_{1-3} alkyl;

X^1 , X^2 , X^3 , X^4 độc lập là $C(R^4)$ trong đó mỗi nhóm R^4 được chọn từ hydro và halo;

L là một liên kết hoặc $-N(R^5)CO-$, trong đó R^5 là hydro;

Ar là homoaryl hoặc heteroaryl;

trong đó homoaryl là phenyl hoặc phenyl được thế bằng một hoặc hai phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkyloxy, và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy;

heteroaryl được chọn từ nhóm bao gồm pyridyl, pyrimidyl, và pyrazyl, mỗi nhóm tùy ý được thế bằng một hoặc hai phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo, xyano, C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkyloxy, và polyhalo- C_{1-3} alkyloxy; hoặc muối cộng hoặc solvat của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

R^1 và R^2 là hydro;

X^1, X^2, X^3, X^4 là CH;

L là một liên kết hoặc $-N(R^5)CO-$, trong đó R^5 là hydro;

Ar là homoaryl hoặc heteroaryl;

trong đó homoaryl là phenyl được thế bằng clo;

heteroaryl được chọn từ nhóm bao gồm pyridyl và pyrimidyl, mỗi nhóm tùy ý được thế bằng một hoặc hai phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm clo, flo, xyano, methyl, và metoxy;

hoặc muối cộng hoặc solvat của nó.

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó nguyên tử cacbon được thế bằng R^3 có cấu hình R.

5. Dược phẩm chứa lượng có tác dụng điều trị của hợp chất như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và chất mang dược dụng.

6. Quy trình bào chế dược phẩm như được xác định trong điểm 5, khác biệt ở chỗ, chất mang dược dụng được trộn kỹ với lượng có tác dụng điều trị của hợp chất như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.