



(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) 
1-0022260

(51)⁷ C07D 487/04, C07F 5/04, C07D 401/14 (13) B

(21)	1-2015-03693	(22)	05.03.2014		
(86)	PCT/US2014/020554	05.03.2014	(87)	WO2014/138168	12.09.2014
(30)	61/773,659	06.03.2013	US		
(45)	25.11.2019	380	(43)	25.01.2016	334
(73)	INCYTE HOLDINGS CORPORATION (US) 1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, DE 19803, United States of America				
(72)	LIU, Pingli (US), WANG, Dengjin (US), WU, Yongzhong (US), CAO, Ganfeng (CN), XIA, Michael (US)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ CHẤT ỨC CHẾ JANUS KINAZA (JAK)

(57) Sáng chế đề xuất các quy trình và chất trung gian để điều chế { 1-{ 1-[3-fluoro-2- (trifluoromethyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)- 1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril có tác dụng điều trị các bệnh liên quan đến hoạt tính của các Janus kinaza (JAK) bao gồm các rối loạn viêm, các rối loạn tự miễn, bệnh ung thư, và các bệnh khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các quy trình và chất trung gian để điều chế {1-{1-[3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril, có tác dụng điều trị các bệnh liên quan đến hoạt tính của Janus kinaza (JAK) bao gồm các rối loạn viêm, rối loạn tự miễn, bệnh ung thư, và các bệnh khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các protein kinaza (PKS) điều hòa các quá trình sinh học đa dạng bao gồm sự tăng trưởng tế bào, sự tồn tại tế bào, sự biệt hóa tế bào, sự hình thành cơ quan, hình thái, tân mạch, sự sửa chữa và tái sinh các mô, trong số những quá trình khác. Protein kinaza còn đóng vai trò đặc biệt vật chủ là người mắc các bệnh bao gồm cả bệnh ung thư. Các xytokin, polypeptit hoặc glycoprotein trọng lượng phân tử thấp, điều hòa nhiều con đường liên quan đến phản ứng viêm của vật chủ đối với nhiễm trùng huyết. Các xytokin có ảnh hưởng đến sự biệt hóa, tăng sinh và hoạt hóa tế bào và có thể điều biến cả phản ứng tiền viêm và chống viêm cho phép vật chủ phản ứng một cách thích hợp với các mầm bệnh. Việc truyền tín hiệu của một loạt các xytokin bao gồm họ Janus kinaza (Jaks) của protein tyrosin kinaza và các chất dẫn truyền và các chất hoạt hóa tín hiệu trong quá trình sao chép (Signal transducers and activators of Transcription - STATs). Có bốn loại JAK của động vật có vú được biết là: JAK1 (Janus kinaza-1), JAK2, JAK3 (còn được gọi là Janus kinaza, bạch cầu; JAKL; và L-JAK), và TYK2 (protein-tyrosin kinaza 2).

Các phản ứng miễn dịch và viêm được kích thích bởi xytokin góp phần tạo mầm bệnh cho các bệnh: các bệnh lý như suy giảm miễn dịch kết hợp nặng (severe combined immunodeficiency - SCID) do sự ức chế của hệ thống miễn dịch gây ra, trong khi phản ứng miễn dịch/viêm hoạt động quá mức hoặc không phù hợp góp phần tạo mầm bệnh cho các bệnh tự miễn (ví dụ, hen suyễn, luput ban đỏ toàn thân, viêm tuyến giáp, viêm cơ tim), và các bệnh như xơ cứng bì và viêm xương khớp (Ortmann, RA, T. Cheng, *et al.* (2000) *Arthritis Res* 2(1): 16-32).

Các thiếu hụt về biểu hiện của các JAK liên quan đến nhiều tình trạng bệnh. Ví dụ, chuột Jak1 -/- bị yếu khi sinh, không bú được, và chết quanh kỳ sinh (Rodig, S. J., M. A. Meraz, *et al.* (1998) *Cell* 93(3): 373-83). Phôi chuột Jak2 -/- bị thiếu máu và chết vào khoảng ngày thứ 12,5 sau giao hợp do không có sự tạo hồng cầu triệt để.

Con đường JAK/STAT, và cụ thể là cả bốn JAK, được cho là đóng vai trò trong việc sinh mầm bệnh trong phản ứng hen, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, viêm phế quản, và bệnh viêm khác có liên quan của đường hô hấp dưới. Nhiều xytokin truyền tín hiệu thông qua các JAK có liên quan đến bệnh/tình trạng viêm đường hô hấp trên, chẳng hạn như những bệnh ảnh hưởng tới mũi và các xoang (ví dụ, viêm mũi và viêm xoang) dù có các phản ứng dị ứng cổ điển hay không. Con đường JAK/STAT cũng được cho là liên quan đến bệnh/tình trạng viêm mắt và các phản ứng dị ứng mạn tính.

Sự hoạt hóa của JAK/STAT ở các bệnh ung thư có thể xảy ra do sự kích thích bởi xytokin (ví dụ IL-6 hoặc GM-CSF) hoặc do giảm các chất ức chế nội sinh trong quá trình truyền tín hiệu của JAK như SOCS (chất ức chế hoặc yếu tố dẫn truyền tín hiệu xytokin - suppressor or cytokine signaling) hoặc PIAS (chất ức chế protein của STAT hoạt hóa - protein inhibitor of activated STAT) (Boudny, V., and Kovarik, J., *Neoplasia*. 49:349-355, 2002). Sự hoạt hóa trong quá trình truyền tín hiệu STAT, cũng như các con đường khác ở hạ nguồn của các JAK (ví dụ, Akt), có mối tương quan với tiên lượng xấu ở nhiều loại ung thư (Bowman, T., *et al. Oncogene* 19:2474-2488, 2000). Nồng độ cao trong máu của các xytokin mà truyền tín hiệu thông qua JAK/STAT đóng vai trò quan hệ nhân quả trong bệnh suy mòn và/hoặc mệt mỏi mạn tính. Như vậy, sự ức chế JAK có thể có lợi cho các bệnh nhân ung thư vì những lý do vượt ra ngoài hoạt tính chống khối u tiềm năng.

JAK2 tyrosin kinaza có thể mang lại lợi ích cho các bệnh nhân bị rối loạn tăng sinh tủy, ví dụ, bệnh đa hồng cầu (Polycythemia vera - PV), tăng tiểu cầu tiên phát (essential thrombocythemia - ET), dị sản tủy với xơ hóa tủy xương (myeloid metaplasia with myelofibrosis - MMM) (Levin, *et al., Cancer Cell*, Vol. 7, 2005: 387-397). Sự ức chế JAK2V617F kinaza làm giảm sự tăng sinh của các tế bào tạo máu, cho thấy JAK2 là mục tiêu tiềm năng cho sự ức chế được lý ở bệnh nhân mắc bệnh PV, ET, và MMM.

Sự ức chế các JAK có thể có lợi cho bệnh nhân bị rối loạn miễn dịch da như bệnh vẩy nến, và mẩn cảm da. Việc duy trì bệnh vẩy nến được cho là phụ thuộc vào một số xytokin gây viêm ngoài các chemokin khác nhau và các yếu tố tăng trưởng (JCI, 113:1664-1675), trong đó có nhiều yếu tố truyền tín hiệu thông qua các JAK (*Adv Pharmacol.* 2000; 47:113-74).

JAK1 đóng vai trò trung tâm trong một số con đường truyền tín hiệu thông qua yếu tố tăng trưởng và xytokin mà, khi rối loạn điều hòa, có thể gây ra hoặc góp phần tạo ra các tình trạng bệnh. Ví dụ, tăng các mức IL-6 ở bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh mà trong đó được cho là gây ra các tác động bất lợi (Fonesca, J.E. et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). Bởi vì các tín hiệu IL-6, ít nhất là một phần, thông qua JAK1, đối kháng IL-6 một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua quá trình ức chế JAK1 được kỳ vọng là mang lại lợi ích lâm sàng (Guschin, D., N., et al *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, J.S., et al. *Lancet* 371:987, 2008). Hơn nữa, ở một số bệnh ung thư, JAK1 bị đột biến dẫn đến sự tăng trưởng và tồn tại tế bào khối u cơ bản không mong muốn (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci USA*.106:9414-8, 2009; Flex E., et al. *J Exp Med*. 205:751-8, 2008). Ở các bệnh tự miễn và bệnh ung thư khác, các mức xytokin gây viêm toàn thân tăng cao mà hoạt hóa JAK1 cũng có thể góp phần gây bệnh và/hoặc các triệu chứng liên quan. Do đó, bệnh nhân mắc các bệnh như vậy có thể được hưởng lợi từ sự ức chế JAK1. Các chất ức chế JAK1 chọn lọc có thể là hữu hiệu trong khi tránh được các tác dụng không mong muốn tiềm tàng và không cần thiết khi ức chế các JAK kinaza khác.

Các chất ức chế JAK1 chọn lọc, so với các JAK kinaza khác, có thể có nhiều lợi ích trị liệu hơn các chất ức chế ít chọn lọc. Về mức độ chọn lọc đối với JAK2, một số xytokin quan trọng và các yếu tố tăng trưởng truyền tín hiệu thông qua JAK2 bao gồm, ví dụ, erythropoietin (Epo) và thrombopoietin (Tpo) (Parganas E, et al. *Cell*. 93:385-95, 1998). Epo là yếu tố tăng trưởng quan trọng trong quá trình sản xuất các tế bào hồng cầu; do đó một số lượng nhỏ yếu tố dẫn truyền tín hiệu phụ thuộc Epo có thể làm giảm số lượng tế bào hồng cầu và gây bệnh thiếu máu (Kaushansky K, *NEJM* 354:2034-45, 2006). Một ví dụ khác về yếu tố tăng trưởng phụ thuộc JAK2 là Tpo đóng vai trò trung tâm trong việc kiểm soát sự tăng sinh và trưởng thành của các tế bào nhân khổng lồ - các tế bào mà từ đó tiểu cầu được sản xuất (Kaushansky K, *NEJM* 354:2034-45, 2006). Như vậy, yếu tố dẫn truyền tín

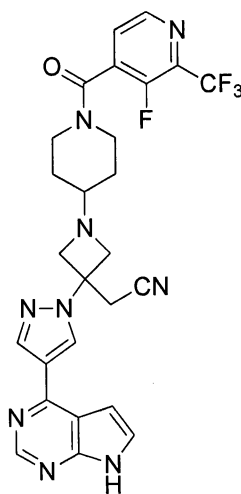
hiệu Tpo giảm sẽ làm giảm số tế bào nhân khổng lồ (chứng thiếu tế bào máu nhân khổng lồ - megakaryocytopenia) và số tiểu cầu trong máu thấp hơn (chứng giảm tiểu cầu). Điều này có thể dẫn đến hiện tượng chảy máu không mong muốn và/hoặc không kiểm soát được. Cũng có thể mong đợi sự ức chế được giảm bớt của các JAK khác, chẳng hạn như JAK3 và Tyk2, bởi vì đã chứng minh được người bị thiếu biến thể chức năng của các kinaza bị mắc nhiều bệnh như suy giảm miễn dịch kết hợp nặng, hoặc hội chứng tăng globulin miễn dịch E (Minegishi, Y, et al. *Immunity* 25:745-55, 2006; Macchi P, et al. *Nature*. 377:65-8, 1995). Do đó, chất ức chế JAK1 có ái lực giảm đối với các JAK khác sẽ có lợi ích đáng kể so với chất ức chế ít chọn lọc hơn đối với các tác dụng phụ giảm liên quan đến sự ức chế miễn dịch, thiếu máu và giảm tiểu cầu.

Do tính hữu dụng của các chất ức chế JAK, nên có nhu cầu phát triển các quy trình mới để điều chế các chất ức chế JAK. Sáng chế hướng đến nhu cầu này và cả các nhu cầu khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

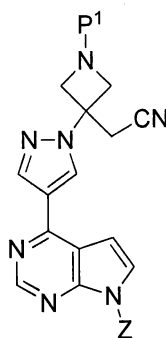
Mục đích của sáng chế là để đáp ứng các nhu cầu nêu trên.

Các chất ức chế JAK được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2011/0224190, mà được đưa vào đây toàn bộ bằng cách viện dẫn, bao gồm {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril, được mô tả dưới đây dưới dạng công thức I.



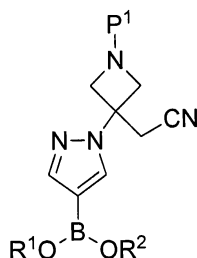
I

Sáng chế đề xuất, không kể các mục đích khác, các quy trình và chất trung gian để điều chế hợp chất có công thức I. Cụ thể, sáng chế đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức II:



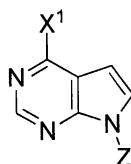
II

bao gồm bước cho hợp chất có công thức III:



III

phản ứng với hợp chất có công thức IV:



IV

trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức II, trong đó:

Z là H hoặc nhóm bảo vệ;

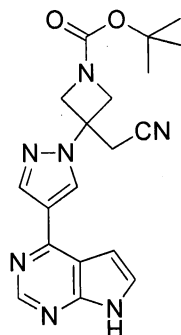
P¹ là nhóm bảo vệ;

X¹ là halo; và

mỗi nhóm R¹ và R² độc lập là H hoặc C₁₋₆ alkyl; hoặc

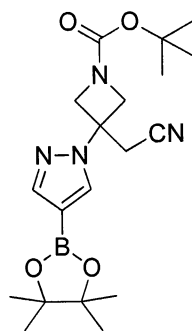
R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức IIa:



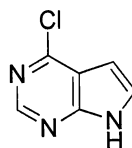
IIa

bao gồm bước cho hợp chất có công thức IIIa:



IIIa

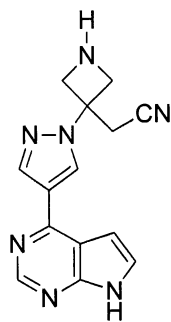
phản ứng với hợp chất có công thức IVa:



IVa

trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức IIa, trong đó các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất có công thức IIIa, hợp chất có công thức IVa, [1,1'-bis(dixyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi (II), xezi florua, và thành phần dung môi, trong đó thành phần dung môi bao gồm nước và tert-butanol.

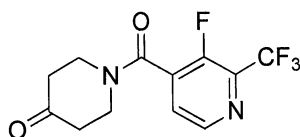
Quy trình này còn bao gồm quy trình khử bảo vệ hợp chất có công thức II hoặc IIa để tạo thành hợp chất có công thức V:



V

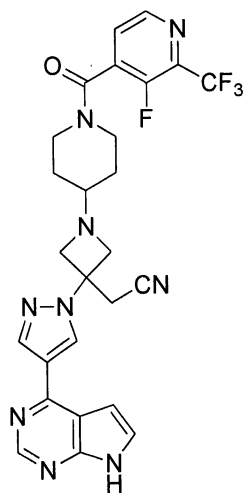
hoặc muối của nó.

Sáng chế còn đề xuất quy trình bao gồm thêm bước cho hợp chất có công thức V, hoặc muối của nó, phản ứng với hợp chất có công thức VI:



VI

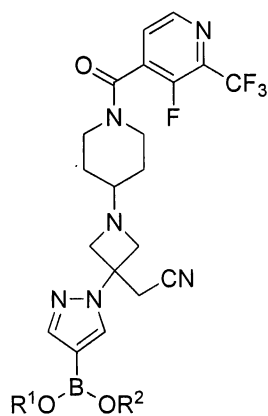
với sự có mặt của chất khử để tạo thành hợp chất có công thức I:



I

hoặc muối của nó.

Sáng chế còn đề xuất các hợp chất có công thức VII:



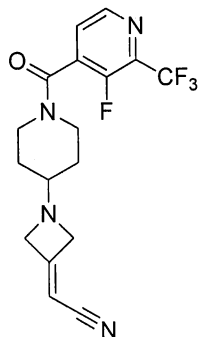
VII

hoặc các muối của chúng; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

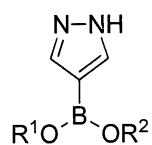
R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức VII, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VIII:



VIII

phản ứng với hợp chất có công thức IX:



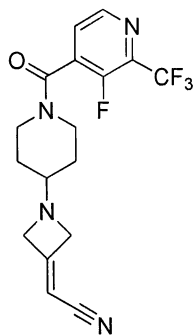
IX

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức VII; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

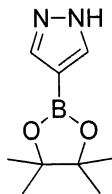
R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức VIIa, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VIII, hoặc muối của nó:



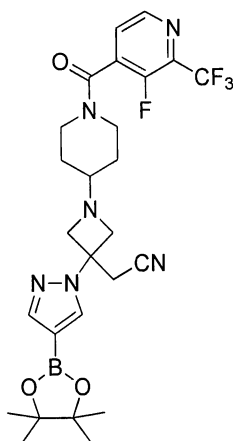
VIII

phản ứng với hợp chất có công thức IXa:



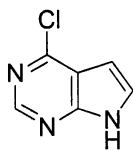
IXa

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức VIIa:



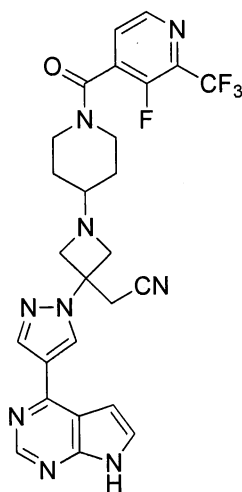
VIIa.

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức I, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VII hoặc VIIa phản ứng với hợp chất có công thức IVa:



IVa

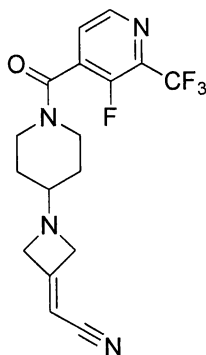
trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức I:



I

trong đó các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng bao gồm hợp chất có công thức VII hoặc VIIa, hợp chất có công thức IVa, chất xúc tác ghép cặp Suzuki, bazơ và thành phần dung môi.

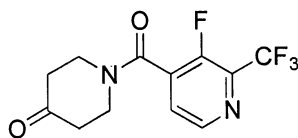
Sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức VIII:



VIII

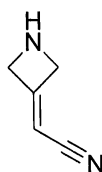
hoặc muối của nó.

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức VIII, hoặc muối của nó, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VI:



VI

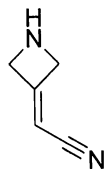
phản ứng với hợp chất có công thức X:



X

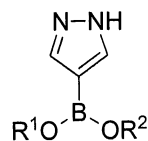
hoặc muối của nó, với sự có mặt của chất khử.

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức III, bao gồm bước cho hợp chất có công thức X:



X

hoặc muối của nó, phản ứng với hợp chất có công thức IX:



IX

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức III, hoặc muối của nó; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ở những phần khác nhau trong bản mô tả này, các phần tử thể của các hợp chất theo sáng chế được bộc lộ theo các nhóm hoặc trong các khoảng. Cụ thể, sáng chế được dự định bao gồm mỗi hoặc mọi dạng tiểu kết hợp riêng rẽ của các thành phần thuộc các nhóm hoặc khoảng này. Ví dụ, thuật ngữ “ C_{1-6} alkyl” được dự tính rõ ràng để bộc lộ một cách riêng rẽ metyl, etyl, C_3 alkyl, C_4 alkyl, C_5 alkyl, và C_6 alkyl.

Cũng nhận thấy rõ ràng rằng, các đặc điểm nhất định của sáng chế, mà, để cho dễ hiểu, được mô tả trong ngữ cảnh của các phương án riêng biệt, cũng có thể được đưa ra kết hợp với phương án đơn lẻ. Ngược lại, các đặc điểm khác nhau của sáng chế, mà, để cho ngắn gọn, được mô tả trong ngữ cảnh của một phương án đơn lẻ, cũng có thể được đưa ra một cách riêng rẽ hoặc theo kiểu tiểu kết hợp thích hợp bất kỳ.

Thuật ngữ “n cạnh” trong đó n là số nguyên thường mô tả số nguyên tử tạo thành vòng trong gốc trong đó số nguyên tử tạo vòng là n. Ví dụ, piperidinyl là một ví dụ về vòng heteroxycloalkyl 6 cạnh và 1,2,3,4-tetrahydro-naphthalen là một ví dụ về nhóm xycloalkyl 10 cạnh.

Đối với các hợp chất theo sáng chế trong đó phần tử biến xuất hiện nhiều hơn một lần, thì mỗi phần tử biến có thể là các gốc khác nhau độc lập được chọn từ nhóm định nghĩa phần tử biến đó. Ví dụ, trường hợp cấu trúc được mô tả có hai nhóm R cùng xuất hiện trên cùng một hợp chất, thì hai nhóm R này có thể biểu diễn cho các gốc khác nhau độc lập được chọn từ nhóm được định nghĩa cho R.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ “tùy ý được thế” có nghĩa là không được thế hoặc được thế. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được thế” có nghĩa là nguyên tử hydro được loại bỏ hoặc được thay thế bằng phần tử thế. Cần hiểu rằng việc thế ở nguyên tử xác định này bị giới hạn bởi hóa trị.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “alkyl”, được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các thuật ngữ khác, để chỉ nhóm hydrocacbon no mà có thể là mạch thẳng

hoặc phân nhánh. Theo một số phương án, nhóm alkyl chứa từ 1 đến 12, 1 đến 8, hoặc 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ về các gốc alkyl bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các nhóm hóa học như metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, tert-butyl, isobutyl, sec-butyl; các chất đồng đẳng cao hơn như 2-metyl-1-butyl, n-pentyl, 3-pentyl, n-hexyl, 1,2,2-trimetylpropyl, n-heptyl, n-octyl, và các chất tương tự. Theo một số phương án, gốc alkyl là metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, neopentyl, n-hexyl, hoặc 2,4,4-trimetyl-pentyl. Theo một số phương án, gốc alkyl là metyl.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “halo” và “halogen”, được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các thuật ngữ khác, dùng để chỉ flo, clo, brom, và iot. Theo một số phương án, halo là clo, brom, hoặc iot. Theo một số phương án, halo là clo.

Như được sử dụng ở đây, “heteroxycloalkyl” dùng để chỉ vòng một vòng không thơm bao gồm các nhóm alkyl và alkenyl đóng vòng, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tạo vòng được thay thế bằng nguyên tử khác loại như nguyên tử O, N, S, hoặc B.

Các quy trình được mô tả ở đây có thể được kiểm tra theo phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự tạo thành sản phẩm có thể được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ, như quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (ví dụ, ^1H hoặc ^{13}C), quang phổ hồng ngoại, hoặc quang phổ kế (ví dụ, UV-khả kiến); hoặc bằng phương pháp sắc ký như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoặc sắc ký lớp mỏng (TLC) hoặc các kỹ thuật liên quan khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phản ứng” được sử dụng như đã biết trong lĩnh vực này và nói chung dùng để chỉ việc mang các chất phản ứng hóa học lại với nhau theo cách cho phép chúng tương tác với nhau ở mức phân tử để có được sự biến đổi hóa học hoặc vật lý. Theo một số phương án, phản ứng gồm hai chất phản ứng, trong đó một hoặc nhiều đương lượng của chất phản ứng thứ hai được sử dụng tương ứng với chất phản ứng thứ nhất. Các bước phản ứng của quy trình được mô tả ở đây có thể được tiến hành trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện thích hợp để điều chế sản phẩm đã nhận dạng.

Việc điều chế các hợp chất có thể bao gồm việc bảo vệ hoặc khử bảo vệ các nhóm hóa học khác nhau. Sự cần thiết đối với việc bảo vệ và khử bảo vệ, và việc

lựa chọn các nhóm bảo vệ thích hợp có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Hóa học về các nhóm bảo vệ có thể tìm được, ví dụ, trong tài liệu của Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Có thể thực hiện việc điều chỉnh đối với các nhóm bảo vệ và các phương pháp tạo thành và tách được mô tả trong bản mô tả này khi cần thiết trên cơ sở các phần tử thể khác nhau.

Các phản ứng của các quy trình được mô tả trong bản mô tả này có thể được tiến hành trong các dung môi thích hợp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực tổng hợp hữu cơ có thể lựa chọn một cách dễ dàng. Các dung môi thích hợp thực chất có thể không phản ứng với các nguyên liệu ban đầu (các chất phản ứng), các chất trung gian, hoặc các sản phẩm ở các nhiệt độ tiến hành phản ứng, ví dụ, nhiệt độ có thể nằm trong khoảng từ nhiệt độ đóng băng của dung môi đến nhiệt độ sôi của dung môi. Phản ứng như vậy có thể được tiến hành trong một dung môi hoặc hỗn hợp gồm nhiều hơn một dung môi. Tùy thuộc vào bước phản ứng cụ thể, có thể lựa chọn các dung môi thích hợp cho bước phản ứng cụ thể. Theo một số phương án, các phản ứng có thể được tiến hành không có mặt dung môi, như khi ít nhất một trong số các chất phản ứng là chất lỏng hoặc chất khí.

Các dung môi thích hợp có thể bao gồm các dung môi được halogen hóa như cacbon tetracloerua, bromodichlometan, dibromodichlometan, bromoform, cloroform, bromodichlometan, dibromodichlometan, butyl clorua, dichlometan, tetrachloetylen, trichloetylen, 1,1,1-trichloetan, 1,1,2-trichloetan, 1,1-dichloetan, 2-clopropan, α,α,α -triflotoluen, 1,2-dichloetan, 1,2-dibromoetan, hexaflorobenzen, 1,2,4-triclobenzen, 1,2-diclobenzen, clobenzen, florobenzen, các hỗn hợp của chúng và các chất tương tự.

Các dung môi ete thích hợp bao gồm: dimetoxymetan, tetrahydrofuran, 1,3-dioxan, 1,4-dioxan, furan, dietylen ete, etylen glycol dimetylen ete, etylen glycol dietylen ete, dietylen glycol dimetylen ete, dietylen glycol dietylen ete, trietylen glycol dimetylen ete, anisol, t-butyl metyl ete, các hỗn hợp của chúng và các chất tương tự.

Các dung môi phân cực proton (protic solvents) thích hợp có thể bao gồm, bằng cách ví dụ và không bị giới hạn ở, nước, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluorotanol, 2,2,2-trifluorotanol, etylen glycol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, rượu i-butylic, rượu t-butylic, 2-etoxietanol, dietylen glycol,

1-, 2-, hoặc 3- pentanol, rượu neo-pentylic, rượu t-pentylic, dietylen glycol monometyl ete, dietylen glycol monoetyl ete, xyclohexanol, rượu benzylic, phenolic, hoặc glyxerol.

Các dung môi phân cực không proton (aprotic solvents) thích hợp có thể bao gồm, bằng cách ví dụ và không bị giới hạn ở, tetrahydrofuran (THF), N,N-dimetylformamit (DMF), N,N-dimetylaxetamit (DMA), 1,3-dimetyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon (DMPU), 1,3-dimetyl-2-imidazolidinon (DMI), N-metylpyrolidinon (NMP), formamit, N-metylaxetamit, N-metylformamit, axetonitril, dimetyl sulfoxit, propionitril, etyl format, metyl axetat, hexacloaxeton, axeton, etyl metyl keton, etyl axetat, sulfolan, N,N-dimetylpropionamit, tetrametylure, nitrometan, nitrobenzen, hoặc hexametylphosphoramit.

Các dung môi hydrocacbon thích hợp bao gồm benzen, xyclohexan, pentan, hexan, toluen, xycloheptan, metylxyclohexan, heptan, etylbenzen, m-, o-, hoặc p-xylen, octan, indan, nonan, hoặc naphtalen.

Các phản ứng của các quy trình được mô tả trong bản mô tả này có thể được tiến hành ở nhiệt độ thích hợp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được. Nhiệt độ phản ứng phụ thuộc vào, ví dụ, điểm nóng chảy và điểm sôi của các chất phản ứng và dung môi, nếu có mặt, nhiệt động học của phản ứng (ví dụ, các phản ứng tỏa nhiệt mạnh có thể cần được tiến hành ở nhiệt độ thấp); và động học của phản ứng (ví dụ, hàng rào cản năng lượng hoạt hóa cao có thể cần nhiệt độ cao). “Nhiệt độ cao” dùng để chỉ nhiệt độ cao hơn nhiệt độ trong phòng (khoảng 22°C).

Các phản ứng của các quy trình được mô tả trong bản mô tả này có thể được tiến hành trong không khí hoặc trong môi trường khí trơ. Thông thường, các phản ứng chứa các chất phản ứng hoặc các sản phẩm mà phản ứng với không khí về cơ bản có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp nhạy không khí, các kỹ thuật này được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết rõ.

Theo một số phương án, việc điều chế các hợp chất có thể bao gồm việc bổ sung các axit hoặc bazơ để tác động đến, ví dụ, sự xúc tác cho phản ứng mong muốn hoặc sự tạo thành các dạng muối như các muối cộng axit.

Các axit làm ví dụ có thể là các axit vô cơ hoặc hữu cơ. Các axit vô cơ bao gồm axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit phosphoric, và axit nitric. Các axit hữu cơ bao gồm axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butanoic, axit benzoic, axit 4-nitrobenzoic, axit metansulfonic, axit p-toluensulfonic, axit benzensulfonic, axit tartric, axit trifloaxetic, axit propiolic, axit butyric, axit 2-butynoic, axit vinyl axetic, axit pentanoic, axit hexanoic, axit heptanoic, axit octanoic, axit nonanoic và axit decanoic.

Các bazơ làm ví dụ bao gồm lithi hydroxit, natri hydroxit, kali hydroxit, lithi cacbonat, natri cacbonat, kali cacbonat, và natri bicacbonat. Một số bazơ mạnh làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở hydroxit, các alkoxit, các amit kim loại, các hydrua kim loại, các dialkylamit và arylamin kim loại, trong đó; các alkoxit bao gồm các muối lithi, natri và kali của các metyl, etyl và t-butyl oxit; các amit kim loại bao gồm natri amit, kali amit và lithi amit; các hydrua kim loại bao gồm natri hydrua, kali hydrua và lithi hydrua; và các dialkylamit kim loại bao gồm các muối natri và kali của các amit metyl, etyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, t-butyl, trimetylsilyl và xyclohexyl được thể.

Các chất trung gian và sản phẩm cũng có thể bao gồm muối của các hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “muối” dùng để chỉ muối được tạo ra bằng cách bổ sung axit hoặc bazơ chấp nhận được vào hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các muối này là các muối được dụng. Như được sử dụng ở đây, cụm từ “được dụng” dùng để chỉ chất được chấp nhận để sử dụng trong các ứng dụng trong lĩnh vực dược theo quan điểm về chất độc và không tương tác theo cách bất lợi với thành phần hoạt tính. Các muối được dụng, bao gồm các muối đơn và muối kép, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các muối có nguồn gốc từ các axit vô cơ và hữu cơ như, nhưng không bị giới hạn ở, axit axetic, axit lactic, axit xitric, axit xinnamic, axit tartric, axit succinic, axit fumaric, axit maleic, axit malonic, axit mandelic, axit malic, axit oxalic, axit propionic, axit clohydric, axit bromhydric, axit phosphoric, axit nitric, axit sulfuric, axit glycolic, axit pyruvic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit toluensulfonic, axit salixylic, axit benzoic, và các axit chấp nhận được tương tự đã biết. Danh sách các muối thích hợp tìm thấy trong tài liệu Remington, Pharmaceutical Sciences, xuất bản lần thứ 17, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, trang 1418 và

tài liệu Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), mỗi tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Khi tiến hành điều chế các hợp chất theo các quy trình được mô tả trong bản mô tả này, các công đoạn tách và tinh chế thông thường như cô, lọc, chiết, chiết pha rắn, tái kết tinh, sắc ký, và các công đoạn tương tự có thể được sử dụng, để tách riêng các sản phẩm mong muốn.

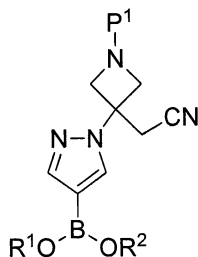
Theo một số phương án, các hợp chất được mô tả ở đây và các muối của chúng, thực chất được tách riêng. Thuật ngữ “thực chất được tách riêng” có nghĩa là hợp chất được tách ít nhất một phần hoặc thực chất được tách ra khỏi môi trường mà chúng được tạo thành hoặc được phát hiện. Việc tách một phần có thể bao gồm, ví dụ, chế phẩm được làm giàu trong hợp chất theo sáng chế. Việc tách thực chất có thể bao gồm các chế phẩm chứa ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 60%, ít nhất là khoảng 70%, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 97%, hoặc ít nhất là khoảng 99% trọng lượng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của nó. Các phương pháp tách các hợp chất và muối của chúng là các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này.

Các quy trình điều chế một số chất trung gian có thể tìm được trong đơn yêu cầu cấp patent tạm thời của Mỹ số 61/531,896, nộp ngày 7 tháng 9 năm 2011, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 12/687,623, nộp ngày 14 tháng 1 năm 2010, và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 13/043,986, nộp ngày 9 tháng 3 năm 2011, mỗi đơn được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Quy trình và chất trung gian

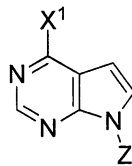
Sáng chế đề xuất, không kể các mục đích khác, các quy trình và chất trung gian để điều chế hợp chất có công thức I. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình, bao gồm bước:

cho hợp chất có công thức III:



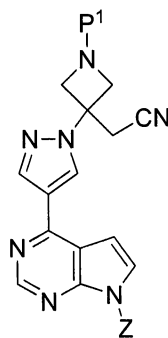
III

phản ứng với hợp chất có công thức IV:



IV

trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức II:



II

trong đó:

Z là H hoặc nhóm bảo vệ;

P¹ là nhóm bảo vệ;

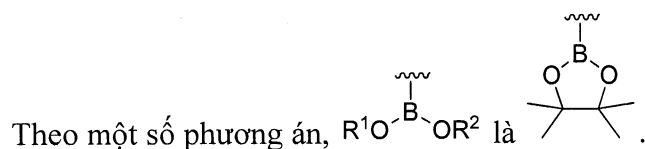
X¹ là halo; và

mỗi nhóm R¹ và R² độc lập là H hoặc C₁₋₆ alkyl; hoặc

R¹ và R², cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C₁₋₄ alkyl.

Theo một số phương án, P¹ là tert-butoxycarbonyl. Các nhóm bảo vệ P₁ thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các nhóm bảo vệ đại diện cho các nhóm amin được mô tả trong tài liệu của Wuts and Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, xuất bản lần thứ tư, John Wiley & Sons: New Jersey, các trang 696-887 (và, cụ thể là các trang 872-887) (2007), được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện

dẫn. Theo một số phương án, P_1 là benzyloxycarbonyl (Cbz), 2,2,2-tricloetoxy carbonyl (Troc), 2-(trimethylsilyl)etoxy carbonyl (Teoc), 2-(4-triflormetylphenylsulfonyl)etoxy carbonyl (Tsc), t-butoxy carbonyl (BOC), 1-adamantyloxy carbonyl (Adoc), 2-adamantyl carbonyl (2-Adoc), 2,4-dimethylpent-3-yloxy carbonyl (Doc), xyclohexyloxy carbonyl (Hoc), 1,1-dimethyl-2,2,2-tricloetoxy carbonyl (TcBOC), vinyl, 2-cloetyl, 2-phenylsulfonyletyl, allyl, benzyl, 2-nitrobenzyl, 4-nitrobenzyl, diphenyl-4-pyridylmetyl, N',N' -dimethylhydrazinyl, metoxymetyl, t-butoxymetyl (Bum), benzyloxymetyl (BOM), hoặc 2-tetrahydropyranyl (THP). Theo một số phương án, P_1 là tri(C_{1-4} alkyl)silyl (ví dụ, tri(isopropyl)silyl). Theo một số phương án, P_1 là 1,1-dietoxymetyl. Theo một số phương án, P_1 là 2-(trimethylsilyl)etoxymetyl (SEM). Theo một số phương án, P_1 là N-pivaloyloxymetyl (POM).

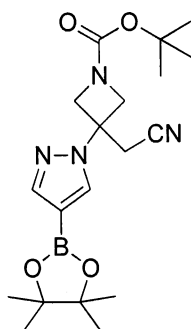


Theo một số phương án, mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là methyl hoặc etyl. Theo một số phương án, mỗi nhóm R^1 và R^2 là methyl. Theo một số phương án, mỗi nhóm R^1 và R^2 là etyl.

Theo một số phương án, X^1 là clo.

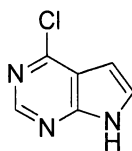
Theo một số phương án, Z là H.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức III có công thức IIIa:



IIIa.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức IV có công thức IVa:



IVa.

Theo một số phương án, các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất có công thức III, hợp chất có công thức IV, chất xúc tác ghép cặp Suzuki, bazơ và thành phần dung môi.

Phản ứng ghép cặp Suzuki trong các quy trình được mô tả ở đây có thể được bắt đầu bằng cách sử dụng một số chất xúc tác Suzuki đã biết khác nhau, bao gồm các chất xúc tác paladi(0) và paladi(II) và được tiến hành trong các điều kiện đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Miyaura and Suzuki, *Chem. Rev.* 1995, 95, 2457-2483, được đưa toàn bộ vào đây). Theo một số phương án, thuật ngữ “với sự có mặt của chất xúc tác” có thể dùng để chỉ việc bổ sung tiền chất xúc tác, mà có mặt dưới dạng khác trong chu kỳ phản ứng. Theo một số phương án, chất xúc tác paladi là $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ và $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$. Theo một số phương án, chất xúc tác là [1,1'-bis(dixyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi (II). Theo một số phương án, chất xúc tác paladi là [1,1'-bis(dixyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi (II) (“Pd-127”), tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0), hoặc tetrakis(tri(o-tolyl)phosphin)paladi(0). Theo một số phương án, chất xúc tác paladi là tetrakis(triphenylphosphin) paladi(0). Theo một số phương án, tải lượng chất xúc tác paladi nằm trong khoảng từ khoảng 1×10^{-4} đến khoảng 0,1 đương lượng. Theo một số phương án, tải lượng chất xúc tác paladi nằm trong khoảng từ khoảng 0,0010 đến khoảng 0,0015 đương lượng.

Theo một số phương án, bazơ là xezi florua. Theo một số phương án, xezi florua có mặt với lượng là 3 đương lượng hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3,5 đương lượng) dựa trên hợp chất có công thức IV. Theo một số phương án, thành phần dung môi có thể bao gồm tert-butanol và nước. Theo một số phương án, tert-butanol và nước có mặt với tỷ lệ theo thể tích là 1:1.

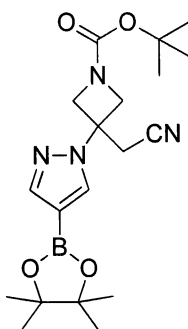
Theo một số phương án, các hợp chất có công thức III và IV có mặt với tỷ lệ mol là khoảng 1:1.

Theo một số phương án, thành phần dung môi bao gồm nước và dung môi hữu cơ. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là 1,4-dioxan, 1-butanol, t-butanol, 1,2-dimethoxyetan (DME), DMF, 2-propanol, toluen hoặc etanol, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, bazơ là bazơ vô cơ. Theo một số phương án, bazơ là bazơ hữu cơ. Theo một số phương án, bazơ là cacbonat của kim loại kiềm (ví dụ, K_2CO_3 hoặc Na_2CO_3). Theo một số phương án, bazơ là kali cacbonat (K_2CO_3) hoặc CsF. Theo một số phương án, hai đến năm đương lượng bazơ (ví dụ, K_2CO_3 , CsF) được sử dụng.

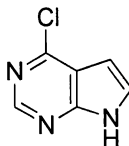
Theo một số phương án, phản ứng ghép cặp Suzuki được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng $80^\circ C$ đến khoảng $100^\circ C$. Theo một số phương án, phản ứng được tiến hành trong thời gian từ hai đến mười hai giờ. Theo một số phương án, hợp chất có công thức II hoặc IIa tùy ý có thể được tách khỏi khối dạng nước của hỗn hợp phản ứng ghép cặp Suzuki hoặc được sử dụng trực tiếp.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các quy trình điều chế hợp chất có công thức IIa, bao gồm bước cho hợp chất có công thức IIIa:



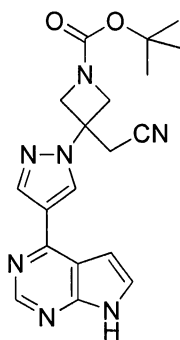
IIIa

phản ứng với hợp chất có công thức IVa:



IVa

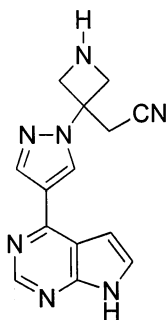
trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức IIa:



IIa

trong đó các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất có công thức IIIa, hợp chất có công thức IVa, [1,1'-bis(dicyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi (II), xezi florua, và thành phần dung môi, trong đó thành phần dung môi bao gồm nước và tert-butanol.

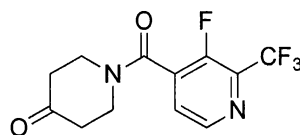
Các quy trình điều chế hợp chất có công thức II hoặc IIa còn có thể bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức II để tạo thành hợp chất có công thức V:



V

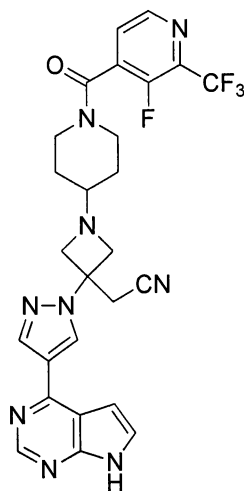
hoặc muối của nó. Bước khử bảo vệ có thể bao gồm phản ứng của hợp chất có công thức II hoặc công thức IIa với axit clohydric (ví dụ, axit clohydric khoảng 5M) trong thành phần dung môi thứ hai (ví dụ, nước và diclometan). Theo một số phương án, axit clohydric được sử dụng với lượng từ 5 đến 8 đương lượng dựa trên hợp chất có công thức II. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thứ hai” trong cụm từ “thành phần dung môi thứ hai” được sử dụng để phân biệt thành phần dung môi này với các thành phần dung môi khác được sử dụng trong các bước trước và sau của quy trình này và không đòi hỏi phải có mặt cả hai dung môi.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức V, hoặc muối của nó, còn được cho phản ứng với hợp chất có công thức VI:



VI

với sự có mặt của chất khử để tạo thành hợp chất có công thức I:



I

hoặc muối của nó.

Theo một số phương án, chất khử là natri xyanoborohydrua hoặc natri triaxetoxylborohydrua. Theo một số phương án, chất khử là natri triaxetoxylborohydrua. Theo một số phương án, nhiều hơn 1 đương lượng (ví dụ, 2 đương lượng) natri triaxetoxylborohydrua được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức V.

Chất khử có thể là chất khử bất kỳ thích hợp để sử dụng trong phản ứng amin hóa khử, bao gồm các chất khử borohydrua và boran khác nhau, như các chất khử được mô tả trong tài liệu của Ellen W. Baxter and Allen B. Reitz, *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents*, Organic Reactions, Chương 1, các trang 1-57 (Wiley, 2002), được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Các loại chất khử thích hợp không giới hạn bao gồm borohydrua, xyanoborohydrua, tri(C₁₋₄ axyl)oxyborohydrua (ví dụ, các dẫn xuất triaxetoxylborohydrua), 9-borobicyclo[3.3.1]nonan hydrua, tri(C₁₋₄ alkyl)borohydrua, và các dẫn xuất disopinocampetylxcyanoborohydrua, các amino boran, phức boran-pyridin, và các alkylamin boran. Các ví dụ không giới hạn về

chất khử thích hợp bao gồm natri xyanoborohydrua, natri triaxetoxymborohydrua, natri xyano-9-borobixyclo[3.3.1]nonan hydrua, tetrabutylamoni xyanoborohydrua, xyanoborohydrua trên chất nền rắn, tetramethylamoni triaxetoxymborohydrua, natri triaxetoxymborohydrua, lithi trietylborohydrua, lithi tri(sec-butyl)borohydrua, natri disopinocampteylxanoborohydrua, catechol boran, boran tetrahydrofuran, natri borohydrua, kali borohydrua, lithi borohydrua, paladi với sự có mặt của khí hydro, 5-etyl-2-metylpyridin boran (PEMB), 2-picolin boran hoặc triaxetoxymborohydrua trên nền polyme. Theo một số phương án, bất kỳ chất nào trong số các chất nêu trên, và tốt hơn là natri xyanoborohydrua, được sử dụng kết hợp với chất phụ gia titan (IV), tác nhân loại nước (dehydrat hóa), hoặc chất phụ gia kẽm halogenua. Theo một số phương án, chất khử là tetra(C₁₋₄ alkyl)amoni xyanoborohydrua hoặc triaxetoxymborohydrua, triaxetoxymbohohydrua hoặc xyanoborohydrua kim loại kiềm, triaxetoxymborohydrua hoặc xyanoborohydrua kim loại kiềm thổ. Theo một số phương án, chất khử là xyanoborohydrua kim loại kiềm. Theo một số phương án, chất khử được chọn từ natri xyanoborohydrua và natri triaxetoxymborohydrua. Theo một số phương án, chất khử là natri triaxetoxymborohydrua. Như được sử dụng ở đây, chất phụ gia titan (IV) là axit Lewis chứa kim loại titan (IV) (ví dụ, titan tetraclorea, titan isopropoxit, titan etoxit, và các chất tương tự).

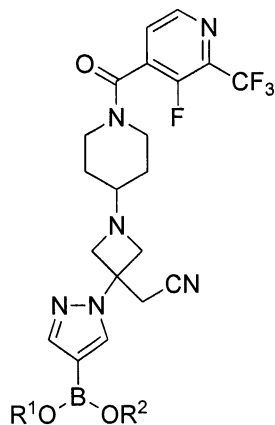
Theo một số phương án, hợp chất có công thức V, hoặc muối của nó, là muối 2-(3-(4-(7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitiril dihydroclorua. Theo một số phương án, phản ứng được tiến hành với sự có mặt của ít nhất hai đương lượng bazơ thứ hai. Theo một số phương án, bazơ thứ hai là amin bậc bốn (ví dụ, trietylamin). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thứ hai” trong cụm từ “bazơ thứ hai” được sử dụng để phân biệt bazơ này với các bazơ khác được sử dụng trong các bước trước và sau của quy trình này và không chỉ ra rằng hai bazơ phải có mặt.

Theo một số phương án, nhiều hơn 1 đương lượng hợp chất có công thức VI được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức V, hoặc muối của nó.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức V, hoặc muối của nó, với hợp chất có công thức VI được tiến hành trong dung môi diclometan.

Theo một số phương án, quy trình này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức I phản ứng với axit adipic để tạo thành muối adipat của hợp chất có công thức I.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức VII:



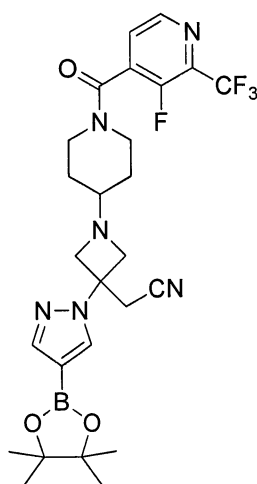
VII

hoặc muối của nó; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

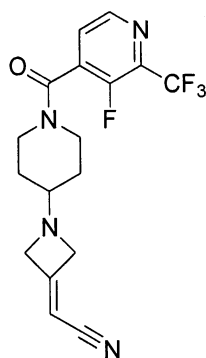
Theo một số phương án, hợp chất có công thức VII là hợp chất có công thức VIIa:



VIIa

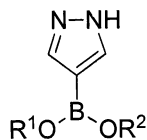
hoặc muối của nó.

Sáng chế còn đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức VII, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VIII:



VIII

phản ứng với hợp chất có công thức IX:



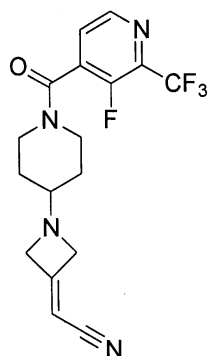
IX

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức VII; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

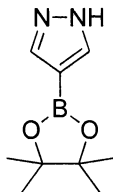
R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

Theo một số phương án, quy trình này bao gồm quy trình điều chế hợp chất có công thức VIIa bao gồm bước cho hợp chất có công thức VIII:



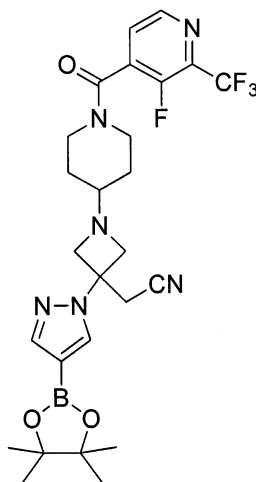
VIII

phản ứng với hợp chất có công thức IXa:



IXa

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức VIIa:

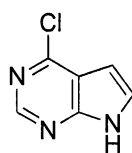


VIIa.

Theo một số phương án, chất ghép cặp cho phản ứng của hợp chất có công thức VIII, với hợp chất có công thức IX hoặc hợp chất có công thức IXa, là 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-5-ene. Theo một số phương án, khoảng 1,05 đến khoảng 1,2 đương lượng (ví dụ, 1,12 đương lượng) chất ghép cặp được sử dụng dựa trên hợp chất có Công thức VIII.

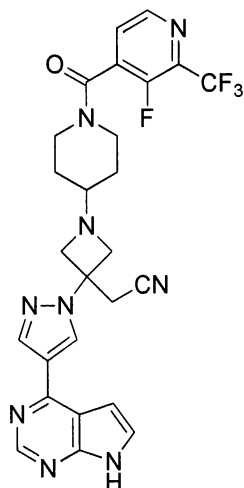
Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức VIII với hợp chất có công thức IX hoặc IXa được tiến hành trong thành phần dung môi bao gồm axetonitril, ở nhiệt độ từ khoảng 40°C đến khoảng 60°C. Theo một số phương án, từ 1 đến 1,2 đương lượng hợp chất có công thức IX hoặc IXa được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức VIII.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức VIIa được cho phản ứng với hợp chất có công thức IVa:



IVa

trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức I:



I

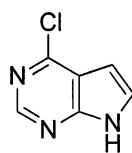
trong đó các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất có công thức VIIa, hợp chất có công thức IVa, chất xúc tác ghép cặp Suzuki, bazơ và thành phần dung môi thứ hai.

Theo một số phương án, chất xúc tác Suzuki là tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0). Theo một số phương án, bazơ (ví dụ, natri bicacbonat) có mặt với lượng là 4 đương lượng hoặc nhiều hơn (ví dụ, 5 đương lượng) dựa trên hợp chất có công thức VII hoặc VIIa.

Theo một số phương án, thành phần dung môi thứ hai bao gồm 1,4-dioxan và nước, ví dụ, với tỷ lệ thể tích là 1:1.

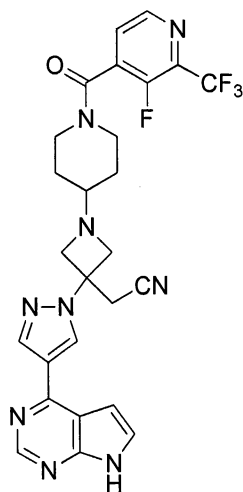
Theo một số phương án, các hợp chất có công thức VII hoặc VIIa, và IVa, có mặt với tỷ lệ mol là khoảng 1:1.

Theo một số phương án, cho hợp chất có công thức VIIa phản ứng với hợp chất có công thức IVa:



IVa

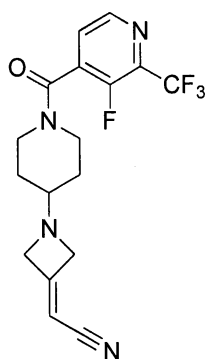
trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức I:



I

trong đó các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất có công thức VIIa, hợp chất có công thức IVa, tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0), natri bicacbonat, và thành phần dung môi thứ hai, trong đó thành phần dung môi thứ hai bao gồm nước và 1,4-dioxan.

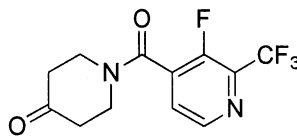
Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức VIII:



VIII

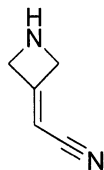
hoặc muối của nó.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức VIII, hoặc muối của nó, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VI:



VI

phản ứng với hợp chất có công thức X:



X

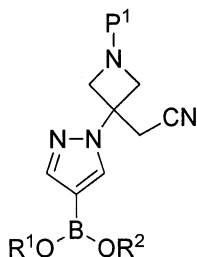
hoặc muối của nó, với sự có mặt của chất khử.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó, là 2-(azetidin-3-yliden)axetonitril hydroclorua.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức VI và hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó, được tiến hành với sự có mặt của chất khử như natri xyanoborohydrua hoặc natri triaxetoxylborohydrua (ví dụ, natri triaxetoxylborohydrua). Khoảng 1,5 đến khoảng 2,5 đương lượng (ví dụ, 2 đương lượng) chất khử có thể được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức VI và hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó, được tiến hành trong thành phần dung môi bao gồm diclometan.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức III:



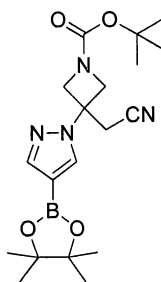
III

hoặc muối của nó; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

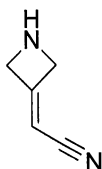
Theo một số phương án, hợp chất có công thức III là hợp chất có công thức IIIa:



IIIa

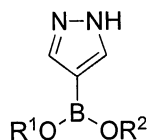
hoặc muối của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức III, bao gồm bước cho hợp chất có công thức X:



X

hoặc muối của nó, phản ứng với hợp chất có công thức IX:



IX

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức III, hoặc muối của nó; trong đó:

mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là H hoặc C_{1-6} alkyl; hoặc

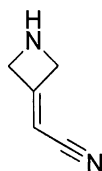
R^1 và R^2 , cùng với hai nguyên tử oxy mà chúng gắn vào và nguyên tử bo mà các nguyên tử oxy gắn vào, tạo thành vòng heteroxycloalkyl có từ 5 đến 6 cạnh, tùy ý được thế bằng 1, 2, 3, hoặc 4 nhóm C_{1-4} alkyl.

Theo một số phương án, chất ghép cặp được sử dụng trong phản ứng của hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó, với hợp chất có công thức IX là 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-5-en. Theo một số phương án, 0,1 đến 0,2 đương lượng chất ghép cặp được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó, với hợp chất có công thức IX được tiến hành trong thành phần dung môi bao gồm rượu isopropylic, ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến khoảng 90°C.

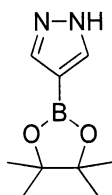
Theo một số phương án, 1 đến 1,1 đương lượng hợp chất có công thức IX được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức X, hoặc muối của nó.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức IIIa, bao gồm bước cho hợp chất có công thức X:



X

phản ứng với hợp chất có công thức IXa:



IXa

với sự có mặt của chất ghép cặp để tạo thành hợp chất có công thức III.

Theo một số phương án, chất ghép cặp được sử dụng trong phản ứng của hợp chất có công thức X với hợp chất có công thức IXa là 1,8-

diazabixyclo[5,4,0]undecen. Theo một số phương án, 0,1 đến 0,2 đương lượng chất ghép cặp được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức X.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức X với hợp chất có công thức IXa được tiến hành trong thành phần dung môi bao gồm rượu isopropyllic, ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến khoảng 90°C.

Theo một số phương án, 1 đến 1,1 đương lượng hợp chất có công thức IXa được sử dụng dựa trên hợp chất có công thức X.

Sử dụng

Hợp chất có công thức I, {1-{1-[3-flu-2-(triflometyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril, là chất ức chế JAK (ví dụ, JAK1, JAK2). Các chất ức chế JAK có tác dụng điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau liên quan đến JAK. Ví dụ về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh liên quan đến hệ miễn dịch bao gồm, ví dụ, thải ghép cơ quan (ví dụ, thải ghép khác loại và bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ). Các ví dụ thêm nữa về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh tự miễn như bệnh đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp thiếu niên, viêm khớp vảy nến, bệnh tiểu đường type I, bệnh luput, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, bệnh nhược cơ năng, các dạng bệnh thận liên quan đến globulin miễn dịch, viêm cơ tim, rối loạn tuyến giáp tự miễn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary - COPD), và các bệnh tương tự. Theo một số phương án, bệnh tự miễn là một dạng rối loạn tự miễn dịch bóng nước da như bệnh pemphigut thông thường (pemphigus vulgaris - PV) hoặc pemphigut dạng bóng nước (bullous pemphigoid - BP).

Các ví dụ thêm nữa về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh dị ứng như hen suyễn, dị ứng thức ăn, viêm da dạng chàm (eczematous dermatitis), viêm da tiếp xúc, viêm da dị ứng (bệnh viêm da cơ địa dị ứng), và viêm mũi. Ví dụ thêm nữa về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh do virus như virus Epstein Barr (EBV), viêm gan B, viêm gan C, HIV, HTLV 1, virus Varicella-Zoster (VZV) và virus gây u nhú ở người (Human Papilloma Virus - HPV) gây ra.

Các ví dụ thêm nữa về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh liên quan đến sự đổi mới sụn, ví dụ, viêm khớp thống phong, viêm khớp do nhiễm hoặc

niêm trùng huyết, viêm khớp phản ứng, loạn dưỡng giao cảm do phản xạ, đau loạn dưỡng, hội chứng Tietze, bệnh viêm khớp ở sườn, viêm xương khớp biến dạng đặc hữu, bệnh Mseleni, bệnh Handigodu, thoái hóa do đau xơ cơ, luput ban đỏ toàn thân, xơ cứng bì, hoặc viêm cột sống dính khớp.

Các ví dụ thêm nữa về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các dạng dị dạng sụn bẩm sinh, bao gồm tiêu sụn di truyền, chứng loạn sản sụn, và chứng giả loạn sản sụn (ví dụ, dị tật tai nhỏ, dị tật tai to, và chứng loạn sản sụn hành xương).

Các ví dụ thêm nữa về các bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm rối loạn về da như bệnh vẩy nến (ví dụ, bệnh vẩy nến thể thông thường), viêm da dị ứng, phát ban da, kích ứng da, dị ứng da (ví dụ, viêm da tiếp xúc hay viêm da tiếp xúc dị ứng). Ví dụ, một số chất nhất định trong một số dược phẩm khi sử dụng khu trú có thể gây kích ứng da. Theo một số phương án, việc đồng sử dụng hoặc sử dụng liên tiếp ít nhất một chất ức chế JAK theo sáng chế cùng với tác nhân gây kích ứng không mong muốn có thể có tác dụng điều trị bệnh da nhạy cảm hoặc viêm da không mong muốn này. Theo một số phương án, rối loạn da được điều trị bằng cách sử dụng khu trú ít nhất một chất ức chế JAK theo sáng chế.

Ví dụ thêm nữa về các bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm những bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi các khối u rắn (ví dụ, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thận, ung thư gan, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến giáp, u nguyên bào xốp, sacom Kaposi, bệnh tăng sản hạch bạch huyết, sacom cơ trơn tử cung, u ác tính, v.v), các bệnh ung thư máu (ví dụ, u lympho, bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu dạng nguyên bào cấp tính (acute lymphoblastic leukemia - ALL), bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (acute myelogenous leukemia - AML) hoặc đa u tủy), và ung thư da như u lympho tế bào T ở da (cutaneous T-cell lymphoma - CTCL) và u lympho tế bào B ở da. Các ví dụ về CTCL bao gồm hội chứng Sezary và các u sùi dạng nấm. Các ví dụ khác về các bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm chứng tăng huyết áp động mạch phổi.

Các ví dụ khác về các bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm bệnh ung thư liên quan đến viêm. Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến bệnh viêm ruột. Theo một số phương án, bệnh viêm ruột là viêm loét đại tràng.

Theo một số phương án, bệnh viêm ruột là bệnh Crohn. Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến viêm là bệnh ung thư liên quan đến viêm đại tràng. Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến viêm là ung thư ruột già hoặc ung thư đại trực tràng. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư dạ dày, khối u caxinoit trong đường tiêu hóa, khối u mô đệm trong đường tiêu hóa (gastrointestinal stromal tumor - GIST), ung thư tuyến, ung thư ruột non, hoặc ung thư trực tràng.

Các bệnh liên quan đến JAK có thể còn bao gồm những bệnh được đặc trưng bởi biểu hiện của: các đột biến JAK2 như các bệnh có ít nhất một đột biến ở miền pseudo-kinaza (ví dụ, JAK2V617F); các đột biến JAK2 có ít nhất một đột biến bên ngoài miền pseudo-kinaza; các đột biến JAK1; các đột biến JAK3; đột biến thụ thể erythropoietin (erythropoietin receptor - EPOR); hoặc biểu hiện rối loạn điều hòa của CRLF2.

Các bệnh liên quan đến JAK có thể còn bao gồm các rối loạn tăng sinh tủy (myeloproliferative disorders - MPDs) như đa hồng cầu nguyên phát (polycythemia vera - PV), tăng tiểu cầu tiên phát (essential thrombocythemia - ET), xơ hóa tủy xương với dị sản tủy xương (myelofibrosis with myeloid metaplasia - MMM), xơ hóa tủy xương nguyên phát (primary myelofibrosis - PMF), bệnh bạch cầu tủy mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), bệnh bạch cầu dòng tủy đơn nhân mạn tính (chronic myelomonocytic leukemia - CMML), hội chứng hypereosinophilic (hypereosinophilic syndrome - HES), bệnh tế bào vón hệ thống (systemic mast cell disease - SMCD), và các bệnh tương tự. Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tủy là xơ hóa tủy xương (ví dụ, xơ hóa tủy xương nguyên phát (primary myelofibrosis - PMF) hoặc hậu đa hồng cầu nguyên phát/xơ hóa tủy xương tăng tiểu cầu tiên phát (Post-PV/Post-ET MF)). Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tủy là hậu xơ hóa tủy xương tăng tiểu cầu tiên phát (post-essential thrombocythemia myelofibrosis - Post-ET MF). Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tủy là hậu xơ hóa tủy xương đa hồng cầu nguyên phát (post polycythemia vera myelofibrosis - Post-PV MF).

Các ví dụ khác về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm hiện tượng làm giảm bớt các tác dụng phụ của dược phẩm khác đối với da bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế. Ví dụ, nhiều dược chất gây phản ứng dị ứng

không mong muốn mà có thể biểu hiện như phát ban dạng mụn hoặc viêm da liên quan. Các ví dụ về dược chất có tác dụng phụ không mong muốn đó bao gồm các thuốc chống ung thư như gefitinib, cetuximab, erlotinib, và các thuốc tương tự. Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng toàn thân hoặc khu trú (ví dụ, ở các vùng lân cận bị viêm da) kết hợp với (ví dụ, đồng thời hoặc tuần tự) các dược chất có tác dụng phụ không mong muốn đối với da. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng khu trú cùng với một hoặc nhiều dược phẩm khác, trường hợp các dược phẩm khác này khi được bôi khu trú mà không có mặt hợp chất theo sáng chế gây ra viêm da tiếp xúc, dị ứng tiếp xúc nhạy cảm, hoặc rối loạn da tương tự. Theo đó, các chế phẩm theo sáng chế bao gồm các công thức chế phẩm dùng khu trú chứa các hợp chất theo sáng chế và dược chất khác mà có thể gây viêm da, rối loạn da, hoặc tác dụng phụ liên quan.

Các bệnh liên quan đến JAK thêm nữa bao gồm chứng viêm và bệnh viêm. Ví dụ về các bệnh viêm bao gồm bệnh sáo, bệnh viêm mắt (ví dụ, viêm mống mắt, viêm màng bồ đào, viêm củng mạc, viêm kết mạc, hoặc bệnh liên quan), các bệnh viêm đường hô hấp (ví dụ, đường hô hấp trên bao gồm mũi và xoang như viêm mũi hoặc viêm xoang hoặc đường hô hấp dưới bao gồm viêm phế quản, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, và các bệnh tương tự), bệnh cơ viêm như viêm cơ tim, và các bệnh viêm khác. Theo một số phương án, bệnh viêm mắt là viêm bờ mi.

Các bệnh liên quan đến JAK thêm nữa bao gồm các tổn thương do thiếu máu cục bộ hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến khả năng xảy ra thiếu máu cục bộ do viêm như đột quỵ hoặc ngừng tim, tình trạng bệnh lý nội độc tố định hướng (ví dụ, các biến chứng sau phẫu thuật hoặc các tình trạng nội độc tố mạn tính gây suy tim mạn tính), chán ăn, suy mòn, mệt mỏi chẳng hạn như do hoặc liên quan đến bệnh ung thư, hiện tượng tái hẹp, viêm cứng bì, xơ hóa, các tình trạng bệnh liên quan đến tình trạng thiếu oxy hoặc tình trạng tăng bất thường các tế bào hình sao (astrogliosis) như, ví dụ, bệnh võng mạc ở người bệnh tiểu đường, bệnh ung thư, hoặc thoái hóa thần kinh, và bệnh viêm khác như hội chứng phản ứng viêm toàn thân (systemic inflammatory response syndrome - SIRS) và sốc do nhiễm trùng.

Các bệnh liên quan đến JAK khác bao gồm bệnh gút và tăng kích thước tuyến tiền liệt do, ví dụ như, phì đại tuyến tiền liệt lành tính hoặc u xơ tuyến tiền liệt lành tính, cũng như các bệnh tiêu xương như loãng xương hoặc viêm xương khớp,

bệnh tiêu xương kết hợp với: sự mất cân bằng nội tiết tố và/hoặc liệu pháp nội tiết tố, bệnh tự miễn dịch (ví dụ như bệnh sarcoid xương), hoặc bệnh ung thư (ví dụ như u tủy).

Các bệnh liên quan đến JAK thêm nữa bao gồm rối loạn khô mắt. Như được sử dụng trong tài liệu này, "rối loạn khô mắt" được dùng để bao gồm các trạng thái bệnh được tóm tắt trong một báo cáo chính thức gần đây của Hội thảo về bệnh khô mắt (Dry Eye Workshop - DEWS), trong đó xác định bệnh khô mắt là "một bệnh đa yếu tố do nước mắt và bề mặt nhãn cầu dẫn đến các triệu chứng khó chịu, rối loạn thị giác, và sự bất ổn định màng nước mắt với những tổn hại tiềm tàng cho bề mặt nhãn cầu. Đi kèm với bệnh khô mắt là sự tăng độ thâm thấu của màng nước mắt và viêm bề mặt nhãn cầu". Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop", *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92, tháng 4 năm 2007, mà toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, rối loạn khô mắt được chọn từ rối loạn mắt khô thiếu nước mắt (aqueous tear-deficient dry eye: ADDE) hoặc rối loạn mắt khô bay hơi, hoặc các dạng kết hợp thích hợp của các rối loạn này. Theo một số phương án, rối loạn khô mắt là hội chứng khô mắt Sjogren (Sjogren syndrome dry eye - SSDE). Theo một số phương án, rối loạn khô mắt là hội chứng khô mắt không phải dạng Sjogren (non-Sjogren syndrome dry eye: NSSDE).

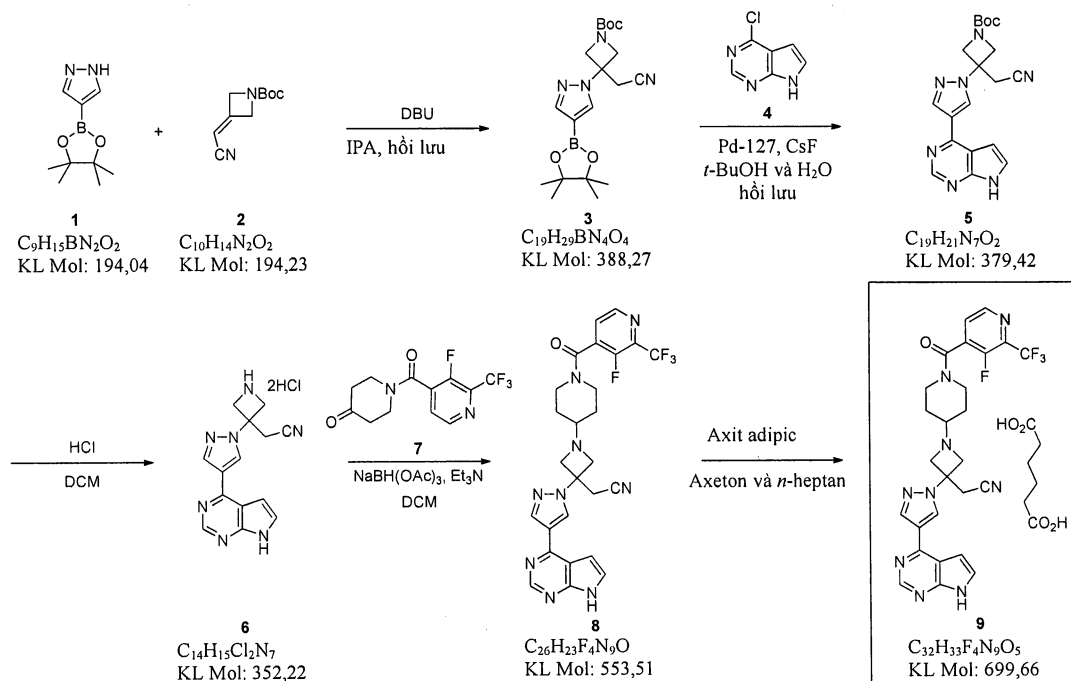
Các bệnh liên quan đến JAK thêm nữa bao gồm viêm kết mạc, viêm màng bồ đào (bao gồm viêm màng bồ đào mạn tính), viêm màng mạch, viêm võng mạc, viêm thể mi, viêm củng mạc, viêm thượng củng mạc, hoặc viêm mống mắt. Các bệnh liên quan đến JAK khác bao gồm rối loạn chức năng hô hấp hay mất chức năng liên quan đến nhiễm virus, như bệnh cúm và SARS.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nhờ các ví dụ cụ thể. Các ví dụ sau được đưa ra nhằm mục đích minh họa, và không làm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ. Các người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận ra nhiều thông số không quan trọng có thể được thay đổi và cải biến để thu được các kết quả thực chất là giống nhau.

Ví dụ 1. Tổng hợp 2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril adipat (9)

Sơ đồ I



tert-butyl 3-(xyanometyl)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-1-carboxylat (3). Cho lần lượt isopropanol (IPA, 200 mL), 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-9-en (DBU, 9,8 g, 64,4 mmol, 0,125 đương lượng), 4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol (1, 101 g, 520,51 mmol, 1,01 đương lượng) và *tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (2, 100 g, 514,85 mmol) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 1 L được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện và thanh khuấy cơ học để tạo ra hỗn hợp phản ứng dưới dạng huyền phù. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng tạo thành đến nhiệt độ hồi lưu trong 30 phút để tạo thành dung dịch đồng nhất và duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ hồi lưu thêm 2 – 3 giờ nữa. Sau khi phản ứng hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, thêm từ từ *n*-heptan (400 mL) vào hỗn hợp phản ứng trong thời gian 45 phút trong khi vẫn duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ hồi lưu. Các chất rắn được kết tủa trong khi thêm *n*-heptan. Khi thêm *n*-heptan xong, từ từ làm nguội hỗn hợp này đến nhiệt độ môi trường và khuấy ở nhiệt độ môi trường thêm 1 giờ nữa.

Thu gom các chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng *n*-heptan (200 mL), và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C đồng thời loại bỏ nitor đến khi trọng lượng không đổi thu được *tert*-butyl 3-(xyanometyl)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)azetidin-1-carboxylat (**3**, 181 g, 199,9 g theo lý thuyết, 90,5%) là chất rắn có màu từ trắng đến vàng nhạt. Dữ liệu của hợp chất **3**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,31 (s, 1H), 7,74 (s, 1H), 4,45 – 4,23 (m, 2H), 4,23 – 4,03 (m, 2H), 3,56 (s, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,25 (s, 12H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155,34, 145,50, 135,88, 116,88, 107,08 (br), 83,15, 79,36, 58,74 (br), 56,28, 27,96, 26,59, 24,63 ppm; C₁₉H₂₉BN₄O₄ (phân tử lượng 388,27), LCMS (EI) *m/e* 389 (M⁺ + H).

***tert*-butyl 3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-(xyanometyl)-azetidin-1-carboxylat (**5**)**. Cho 4-clo-7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**4**, 39,6 g, 257,6 mmol), *tert*-butyl 3-(xyanometyl)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)azetidin-1-carboxylat (**3**, 100 g, 257,6 mmol, 1,0 đương lượng), xezi florua (136,9 g, 901,4 mmol, 3,5 đương lượng), *tert*-butanol (250 mL), nước (250 mL), và [1,1'-bis(di-xyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi(II) (Pd-127, 351,4 mg, 0,46 mmol, 0,0018 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 1 L được trang bị cửa dẫn khí nitor vào, cặp nhiệt điện và thanh khuấy cơ học. Hỗn hợp phản ứng tạo thành được loại khí và được nạp lại khí nitor 3 lần trước khi được gia nhiệt đến nhiệt độ hồi lưu và được giữ ở nhiệt độ hồi lưu trong môi trường khí nitor trong thời gian từ 20 – 24 giờ. Khi phân tích HPLC chỉ ra phản ứng đã hoàn thành, làm nguội hỗn hợp phản ứng đến 45 – 55°C trong thời gian 30 phút, tách hai pha này, và gạn bỏ pha nước. Thêm *n*-heptan (125 mL) vào pha hữu cơ này trong 30 phút ở nhiệt độ 45 – 55°C. Làm nguội từ từ hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ môi trường trong một giờ và khuấy ở nhiệt độ môi trường thêm 2 giờ nữa. Thu các chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng *n*-heptan (100 mL), và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C đồng thời loại bỏ nitor đến khi trọng lượng không đổi thu được *tert*-butyl 3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-(xyanometyl)-azetidin-1-carboxylat (**5**, 96,8 g, 97,7 g theo lý thuyết, 99%) là chất rắn màu vàng nhạt. Dữ liệu của hợp chất **5**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,89 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,60 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 4,62 – 4,41 (m, 2H), 4,31 –

4,12 (m, 2H), 3,67 (s, 2H), 1,39 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 155,40, 152,60, 150,63, 149,15, 139,76, 129,53, 127,65, 122,25, 116,92, 113,21, 99,71, 79,45, 58,34 (br), 56,80, 27,99, 26,83 ppm; $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_2$ (phân tử lượng 379,4), LCMS (EI) m/e 380 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Muối 2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua (6). Cho *tert*-butyl 3-(4-(7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-3-(xyanometyl)azetidin-1-carboxylat (**5**, 15 g, 39,5 mmol), nước (7,5 mL, 416 mmol) và diclometan (75 mL) ở nhiệt độ trong phòng vào bình cầu dung tích 0,5 L được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện, phễu bổ sung, và thanh khuấy cơ học. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng để tạo ra thể huyền phù. Thêm dung dịch chứa hydro clorua (HCl) 5M trong isopropanol (55 mL, 275 mmol, 7,0 đương lượng) vào thể huyền phù này trong thời gian 5 phút. Sau đó, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng tạo thành đến nhiệt độ hồi lưu nhẹ và duy trì ở nhiệt độ hồi lưu trong thời gian từ 3-4 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, thêm *tert*-butyl methyl ete (TBME, 45 mL) vào thể huyền phù phản ứng. Từ từ làm nguội hỗn hợp này đến nhiệt độ trong phòng, và khuấy thêm một giờ nữa. Thu gom các chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng *tert*-butyl methyl ete (TBME, 45 mL) và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C đồng thời loại bỏ nitơ đến khi trọng lượng không đổi thu được muối 2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua (**6**, 13,6 g, 13,9 g theo lý thuyết, 98%) là chất rắn có màu trắng nhạt đến vàng nhạt. Dữ liệu của hợp chất **6**: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8,96 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,78 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 7,09 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 4,93 (d, $J = 12,8$ Hz, 2H), 4,74 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H), 3,74 (s, 2H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 151,35, 143,75, 143,33, 141,33, 132,03, 131,97, 115,90, 114,54, 113,85, 103,18, 59,72, 54,45 (2C), 27,02 ppm; $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_7$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_7$ là công thức của bazơ tự do, phân tử lượng 279,30), LCMS (EI) m/e 280 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-fluoro-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (8, bazơ tự do). Cho muối 2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua (**6**, 20 g, 56,78 mmol), diclometan (200 mL) và triethylamin (TEA, 16,62 mL, 119,2 mmol, 2,1 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường

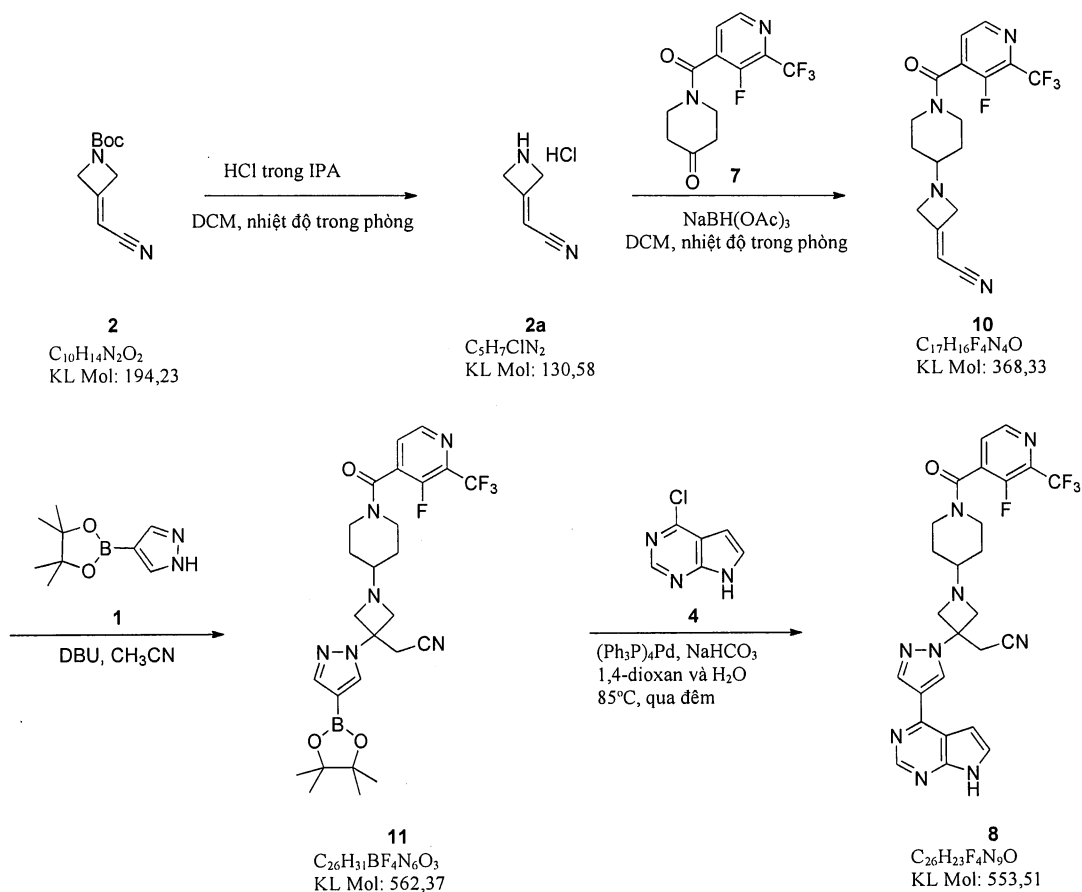
vào bình cầu dung tích 0,5 L được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện, phễu bổ sung, và thanh khuấy cơ học. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 30 phút trước khi thêm 1-(3-flo-2-(triflometyl)-isonicotinoyl)piperidin-4-on (**7**, 17,15 g, 57,91 mmol, 1,02 đương lượng) vào hỗn hợp này. Sau đó xử lý hỗn hợp này bằng natri triaxetoxyborohydrua (25,34 g, 113,6 mmol, 2,0 đương lượng) trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ môi trường (dưới 26°C). Khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 giờ. Sau khi phản ứng đã hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, dùng hỗn hợp phản ứng bằng dung dịch nước NaHCO₃ bão hòa (200 mL). Tách hai pha và chiết pha nước bằng metylen clorua (200 mL). Rửa pha hữu cơ đã gộp lại bằng nước muối 4% (100 mL) sau đó chuyển dung môi metylen clorua thành axeton bằng cách chưng cất. Dung dịch tạo thành chứa sản phẩm thô mong muốn (**8**) trong axeton được sử dụng trực tiếp để điều chế muối adipat sau đó. Tinh chế một phần nhỏ dung dịch bằng phương pháp sắc ký cột (SiO₂, rửa giải bằng gradient 0 – 10% MeOH trong EtOAc) thu được 2-(3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril tinh khiết theo phân tích (Bazơ tự do **8**) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **8**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,17 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,70 (m, 2H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 3,6, 2,3 Hz, 1H), 7,09 (dd, *J* = 3,6, 1,7 Hz, 1H), 4,10 (m, 1H), 3,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 3,61 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,46 (m, 1H), 3,28 (t, *J* = 10,5 Hz, 1H), 3,09 (ddd, *J* = 13,2, 9,5, 3,1 Hz, 1H), 2,58 (m, 1H), 1,83 – 1,75 (m, 1H), 1,70 – 1,63 (m, 1H), 1,35 – 1,21 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,28, (153,51, 150,86), 152,20, 150,94, 149,62, (146,30, 146,25), 139,48, (134,78, 134,61), (135,04, 134,92, 134,72, 134,60, 134,38, 134,26, 134,03, 133,92), 129,22, 127,62, 126,84, 121,99, 122,04, (124,77, 122,02, 119,19, 116,52), 117,39, 113,00, 99,99, 61,47, 60,49, 57,05, 44,23, 28,62, 27,88, 27,19 ppm; C₂₆H₂₃F₄N₉O (phân tử lượng, 553,51), LCMS (EI) *m/e* 554,1 (M⁺ + H).

2-(3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril adipat (9**).**
Cho dung dịch chứa 2-(3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril thô (**8**

bazơ tự do, 31,38 g, 56,7 mmol) trong axeton (220 mL) và axit apidic (8,7 g, 59,53 mmol, 1,05 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 0,5 L được trang bị thanh khuấy cơ học, cặp nhiệt điện, phễu bổ sung, và cửa dẫn khí nitơ vào. Sau đó gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ hồi lưu tạo ra dung dịch. Thêm từ từ *n*-heptan (220 mL) vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 40 – 50°C trong một giờ. Từ từ làm nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ môi trường trong một giờ và khuấy ở nhiệt độ môi trường thêm 16 giờ nữa. Thu gom các chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng *n*-heptan (2 X 60 mL), và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C đồng thời loại bỏ nitơ đến khi trọng lượng không đổi thu được 2-(3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-*fluoro*-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril adipat (**9**, 34,0 g, 39,7 g theo lý thuyết, 85,6% trong hai bước) là chất rắn màu trắng đến trắng nhạt. Dữ liệu của hợp chất **9**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,16 (s, 1H), 12,05 (brs, 2H), 8,85 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,69 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 3,6, 2,3 Hz, 1H), 7,09 (dd, *J* = 3,6, 1,7 Hz, 1H), δ 4,11 (dt, *J* = 11,0, 4,4 Hz, 1H), 3,77 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,60 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,58 (s, 2H), 3,44 (dt, *J* = 14,4, 4,6 Hz, 1H), 3,28 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,09 (ddd, *J* = 13,2, 9,6, 3,2 Hz, 1H), 2,58 (tt, *J* = 8,6, 3,5 Hz, 1H), 2,28 – 2,17 (m, 4H), 1,83 – 1,74 (m, 1H), 1,67 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 1,59 – 1,46 (m, 4H), 1,37 – 1,21 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,38, 160,29, (153,52, 150,87), 152,20, 150,94, 149,63, (146,30, 146,25), 139,48, (134,79, 134,62), (135,08, 134,97, 134,74, 134,62, 134,38, 134,28, 134,04, 133,93), 129,21, 127,62, 126,84, 122,05, (124,75, 122,02, 119,29, 116,54), 117,39, 113,01, 99,99, 61,47, 60,50, 57,06, 44,24, 33,42, 30,70, 28,63, 27,89, 27,20, 24,07 ppm; C₃₂H₃₃F₄N₉O₅ (phân tử lượng 699,66; C₂₆H₂₃F₄N₉O là công thức của bazơ tự do, phân tử lượng, 553,51), LCMS (EI) *m/e* 554,0 (M⁺ + H).

Ví dụ 2: Tổng hợp 2-(3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-*fluoro*-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril theo cách khác

Sơ đồ II



2-(azetidin-3-yliden)axetonitril hydroclorua (2a). Cho *tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (**2**, 30 g, 154,46 mmol) và metylenclorua (300 mL) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 0,5 L được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện và thanh khuấy cơ học. Sau đó xử lý dung dịch này bằng dung dịch hydro clorua (HCl) 5M trong dung dịch isopropanol (294,2 mL, 1,54 mol, 10 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường và khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 18 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, thêm *tert*-butyl metyl ete (TBME, 150 mL) vào thể huyền phù này, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 giờ. Thu gom các chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng *n*-heptan (2 X 100 mL), và làm khô trên phễu lọc ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 3 giờ thu được 2-(azetidin-3-yliden)axetonitril hydroclorua (**2a**, 13,7 g, 20,2 g theo lý thuyết, 67,8%) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **2a**: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,99 (s, 2H), 5,94 (p, *J* = 2,5 Hz, 1H), 4,85 – 4,80 (m, 2H), 4,77 – 4,71 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155,65, 114,54, 94,78, 55,26, 54,63 ppm;

$C_5H_7ClN_2$ (phân tử lượng 130,58; $C_5H_6N_2$ là công thức của bazơ tự do, phân tử lượng 94,11), LCMS (EI) m/e 95 ($M^+ + H$).

2-(1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-

yliden)axetonitril (10). Cho 2-(azetidin-3-yliden)axetonitril hydroclorua (**2a**, 4,5 g, 34,46 mmol), 1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-on (**7**, 10 g, 34,46 mmol, 1,0 đương lượng), và metylenclorua (100 mL) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 0,25 L được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện, và con khuấy từ và sau đó xử lý hỗn hợp tạo thành bằng natri triaxetoxymetaphorua (14,6 g, 68,93 mmol, 2,0 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 giờ trước khi dừng phản ứng bằng dung dịch nước natri bicacbonat ($NaHCO_3$) bão hòa (50 mL). Tách hai pha này và chiết pha nước bằng diclometan (200 mL). Rửa pha hữu cơ đã gộp lại bằng nước (50 mL) và nước muối (50 mL) và cô dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô mong muốn (**10**), tinh chế sản phẩm này bằng phương pháp sắc ký cột (SiO_2 , rửa giải bằng gradient 0 – 10% etyl axetat trong hexan) thu được 2-(1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yliden)axetonitril (**10**, 9,5 g, 12,7 g theo lý thuyết, 74,8%) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **10**: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,57 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 7,54 (t, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,29 (p, $J = 2,4$ Hz, 1H), 4,18 – 4,08 (m, 1H), 4,08 – 4,03 (m, 2H), 3,98 – 3,94 (m, 2H), 3,57 – 3,39 (m, 2H), 3,17 – 3,04 (m, 1H), 2,56 (tt, $J = 7,4, 3,5$ Hz, 1H), 1,86 – 1,77 (m, 1H), 1,75 – 1,64 (m, 1H), 1,54 – 1,43 (m, 1H), 1,43 – 1,31 (m, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 161,34, 160,73, 152,62 (d, $J = 269,1$ Hz), 145,75 (d, $J = 6,1$ Hz), 136,73 (qd, $J = 36,1, 12,0$ Hz), 134,56 (d, $J = 16,9$ Hz), 126,89, 120,58 (qd, $J = 275,0, 4,9$ Hz), 115,11, 92,04, 62,05, 60,57 (2C), 44,47, 39,42, 29,38, 28,47 ppm; $C_{17}H_{16}F_4N_4O$ (phân tử lượng 368,33), LCMS (EI) m/e 369 ($M^+ + H$).

2-(1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril

(11). Cho 4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol (**1**, 210 mg, 1,08 mmol, 1,08 đương lượng), 2-(1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yliden)axetonitril (**10**, 370 mg, 1,0 mmol) và axetonitril (3 mL) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 25 mL được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện, và con khuấy từ. Sau đó xử

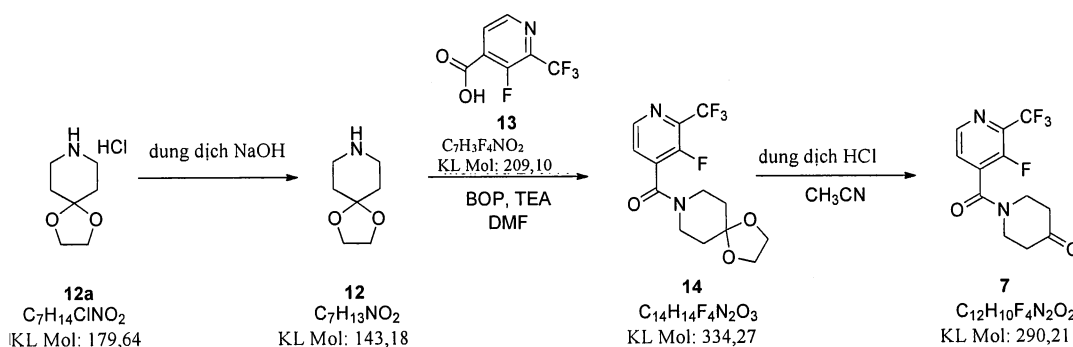
lý dung dịch này bằng 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU, 173 mg, 0,17 mL, 1,12 mmol, 1,12 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường và làm ấm hỗn hợp phản ứng tạo thành đến 50°C và khuấy ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Khi phản ứng đã hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, nạp trực tiếp hỗn hợp phản ứng trên cột silica gel (SiO₂) để tinh chế theo phương pháp sắc ký (rửa giải bằng gradient 0 – 2,5% MeOH trong ethyl axetat) thu được 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)-3-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (**11**, 263 mg, 562,4 mg theo lý thuyết, 46,7%) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **11**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,64 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 8,22 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H), 7,88 (dd, *J* = 4,7 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H), 4,10 – 3,99 (m, 1H), 3,58 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,52 – 3,42 (m, 2H), 3,44 (s, 2H), 3,41 – 3,33 (m, 1H), 3,28 – 3,15 (m, 1H), 3,03 (ddd, *J* = 12,9, 9,2, 3,2 Hz, 1H), 2,51 – 2,44 (m, 1H), 1,77 – 1,66 (m, 1H), 1,64 – 1,54 (m, 1H), 1,28 – 1,17 (m, 2H), 1,24 (s, 12H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,22, 152,13 (d, *J* = 265,8 Hz), 146,23 (d, *J* = 5,7 Hz), 145,12, 135,41, 134,66 (d, *J* = 16,9 Hz), 134,43 (qd, *J* = 35,0, 11,7 Hz), 127,58, 120,61 (qd, *J* = 274,4, 4,6 Hz), 117,35, 106,59 (br), 83,10, 61,40, 60,53 (2C), 56,49, 44,17, 38,99, 28,55, 27,82, 27,02, 24,63 ppm; C₂₆H₃₁BF₄N₆O₃ (phân tử lượng 562,37), LCMS (EI) *m/e* 563 (M⁺ + H).

2-(3-(4-(7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (8**). Cho 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)-3-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (**11**, 307 mg, 0,546 mmol), 4-clo-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**4**, 84,8 mg, 0,548 mmol, 1,0 đương lượng), natri bicacbonat (NaHCO₃, 229 mg, 2,72 mmol, 5,0 đương lượng), nước (1,6 mL), và 1,4-dioxan (1,6 mL) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu dung tích 25 mL được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, cặp nhiệt điện, phễu bổ sung, và con khuấy từ. Sau đó, xử lý hỗn hợp này bằng tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) (12,8 mg, 0,011 mmol, 0,02 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường và hỗn hợp phản ứng tạo thành được loại khí và được nạp lại khí nitơ 3 lần trước khi được gia nhiệt đến 85°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 85°C trong môi trường khí nitơ qua đêm. Khi phản ứng đã hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, cô hỗn hợp**

phản ứng đến khô dưới áp suất giảm và thu được sản phẩm mong muốn, 2-(3-(4-(7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-flo-2-(triflometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (**8** bazơ tự do, 135 mg, 302,2 mg theo lý thuyết, 44,6%), là các chất rắn màu trắng nhạt bằng cách tinh chế hỗn hợp sản phẩm khô này bằng phương pháp sắc ký silica gel (SiO₂) trực tiếp (rửa giải bằng gradient etyl axetat 0 – 10% trong hexan). Hợp chất thu được theo phương pháp tổng hợp này là giống với hợp chất **8** được sản xuất theo phương pháp tổng hợp theo mô tả trong ví dụ 1 trên đây về mọi khía cạnh có thể so sánh.

Ví dụ 3. Tổng hợp (3-flo-2-(triflometyl)pyridin-4-yl) (1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon

Sơ đồ III



(3-flo-2-(triflometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (14**).** Nạp natri hydroxit (NaOH, 1,4 kg, 35 mol, 2,0 đương lượng) và nước (7 L) vào bình phản ứng dung tích 30 L được trang bị thanh khuấy cơ học, phễu bổ sung và vách ngăn và xử lý dung dịch tạo thành bằng 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan hydroclorua (3,13 kg, 17,43 mol) ở nhiệt độ môi trường. Sau đó khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 30 phút trước khi làm bão hòa bằng natri clorua rắn (1,3 kg) và chiết bằng 2-metyl-tetrahydrofuran (3 x 7 L). Làm khô pha hữu cơ đã được gộp lại bằng natri sulfat khan (Na₂SO₄, 1,3 kg) và cô dưới áp suất giảm (70 mmHg) ở nhiệt độ 50°C sau khi loại bỏ chất làm khô, natri sulfat (Na₂SO₄), bằng cách lọc. Theo đó chưng cất dầu màu vàng thu được dưới áp suất giảm (80 mmHg, nhiệt độ sôi 115 đến 120°C) thu được 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan (2,34 kg, 2,496 kg theo lý thuyết, 93,8%) là dầu trong, dầu này được sử dụng trực tiếp trong phản ứng ghép cặp sau đó.

Nạp axit 3-flo-2-(triflometyl)isonicotinic (**13**, 3,0 kg, 14,35 mol), benzotriazol-1-yloxytris(dimetylamin)phosphoni hexaflophosphat (chất phản ứng BOP, 7,6 kg, 17,2 mol, 1,2 đương lượng), 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan (2,34 kg, 16,36 mol, 1,14 đương lượng) và *N,N*-dimetylformamit (DMF, 18 L) ở nhiệt độ môi trường vào bình phản ứng khô dung tích 100 L được trang bị thanh khuấy cơ học, phễu bổ sung, nhiệt kế và cửa ra chân không. Sau đó khuấy dung dịch tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 20 phút trước khi làm nguội 5 đến 10°C. Sau đó thêm trietylamin (Et₃N, 4 L, 28,67 mol, 2,0 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng trong thời gian 1 giờ và giữ nhiệt độ bên trong trong khoảng từ 5°C đến 10°C trong khi thêm trietylamin. Theo đó khuấy dung dịch màu nâu sẫm thu được trong 12 giờ ở nhiệt độ môi trường (xấp xỉ 20°C) và sau đó làm lạnh ở khoảng 10°C. Khuấy mạnh, thêm lần lượt 18 L dung dịch nước natri bicacbonat (NaHCO₃) bão hòa và 36 L nước vào hỗn hợp phản ứng đã được làm lạnh và giữ nhiệt độ bên trong dưới 15°C. Thu gom kết tủa (bánh lọc) thu được như vậy bằng cách lọc. Sau đó, làm bão hòa pha nước bằng 12 kg natri clorua rắn (NaCl) và chiết bằng EtOAc (2 x 18 L). Rửa lớp hữu cơ đã được gộp lại lần lượt bằng dung dịch nước natri bicacbonat (NaHCO₃) bão hòa (18 L), và nước (2 x 18 L). Thu lấy bánh lọc sau đó hòa tan lại trong pha hữu cơ và rửa dung dịch màu nâu sẫm thu được bằng nước (2 x 18 L) trước khi cô dưới áp suất giảm (40 – 50°C, 30 mm Hg) thu được xấp xỉ 5,0 kg sản phẩm thô mong muốn (**14**) là dầu màu vàng nhớt. Sau đó hòa tan sản phẩm thô thu được ở trên trong EtOH (8,15 L) ở nhiệt độ 50°C và xử lý dung dịch tạo thành bằng nước (16,3 L) trong 30 phút ở nhiệt độ khoảng 50°C. Dung dịch màu nâu được gieo mầm kết tinh trước khi làm nguội từ từ đến nhiệt độ môi trường (xấp xỉ 20°C) trong thời gian 3 giờ đồng thời khuấy và khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 12 giờ. Thu các chất rắn bằng cách lọc, rửa bằng hỗn hợp bao gồm EtOH và nước (EtOH : H₂O = 1 : 20, 2 L) và làm khô dưới áp suất giảm (50 mmHg) ở nhiệt độ xấp xỉ 60°C trong thời gian 24 giờ thu được (3-flo-2-(triflometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (**14**, 3,98 kg, 4,797 kg theo lý thuyết, 83,0%) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **14**: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,64 (d, ³J_{HH} = 4,68 Hz, 1H, NCH trong pyridin), 7,92 (dd, ³J_{HH} = 4,68 Hz, ⁴J_{HF} = 4,68 Hz, 1H, NCCH trong pyridin), 3,87 - 3,91 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3,70 (br s, 2H, một trong các nhóm NCH₂ trong vòng piperidin, một trong các nhóm

NCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí trực), 3,26 (t, $^3J_{HH} = 5,86$ Hz, 2H, một trong các nhóm NCH₂ trong vòng piperidin, một trong các nhóm NCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí gần xích đạo), 1,67 (d, $^3J_{HH} = 5,86$ Hz, 2H, một trong các nhóm NCCH₂ trong vòng piperidin, một trong các nhóm NCCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí gần xích đạo), 1,58 (br s, 2H, một trong các nhóm NCCH₂ trong vòng piperidin, một trong các nhóm NCCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí trực) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,03 (N-C=O), 151,16 (d, $^1J_{CF} = 266,03$ Hz, C-F), 146,85 (d, $^4J_{CF} = 4,32$ Hz, NCH trong pyridin), 135,24 (d, $^2J_{CF} = 11,51$ Hz, C-C=O), 135,02 (vạch tư, $^2J_{CF} = 34,57$ Hz, NCCF₃), 128,24 (d, $^4J_{CF} = 7,48$ Hz, NCCH trong pyridin), 119,43 (d $\times$ vạch tư, $^1J_{CF} = 274,38$ Hz, $^3J_{CF} = 4,89$ Hz, CF₃), 106,74 (OCO), 64,60 (OCCO), 45,34 (NC trong vòng piperidin), 39,62 (NC trong vòng piperidin), 34,79 (NCC trong vòng piperidin), 34,10 (NCC trong vòng piperidin) ppm; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64,69 (d, $^4J_{FF} = 15,85$ Hz, F₃C), -129,26 (d $\times$ vạch tư, $^4J_{FF} = 15,85$ Hz, $^4J_{FH} = 3,96$ Hz, FC) ppm; C₁₄H₁₄F₄N₂O₃ (phân tử lượng, 334,27), LCMS (EI) *m/e* 335,1 (M⁺ + H).

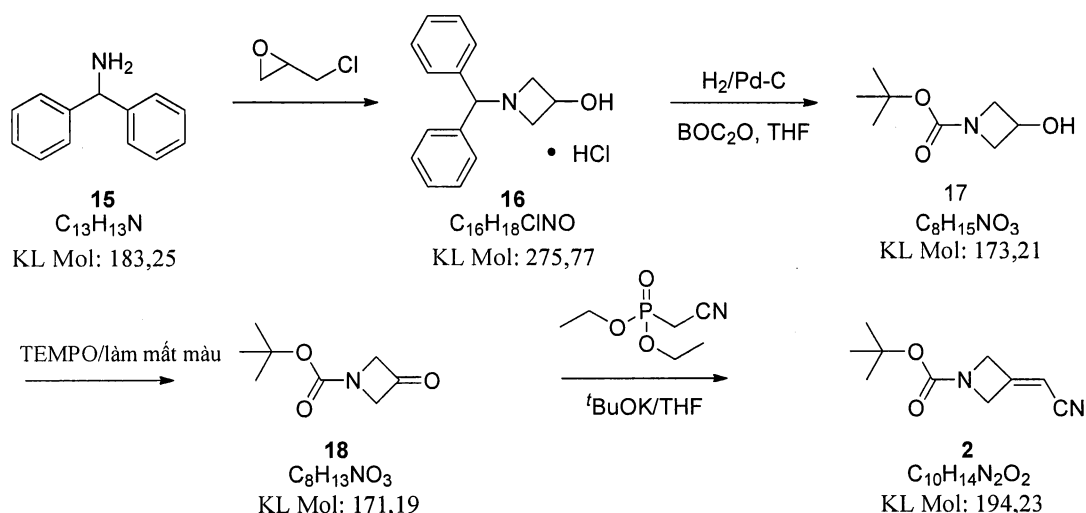
(3-flo-2-(triflometyl)pyridin-4-yl) (1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon

(7). Nạp (3-flo-2-(triflometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (**14**, 100 g, 0,299 mol) trong axetonitril (ACN, 400 mL) ở nhiệt độ môi trường vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 5 L được trang bị thanh khuấy cơ học, cặp nhiệt điện, phễu bổ sung và cửa dẫn khí nitơ vào. Làm lạnh dung dịch tạo thành xuống dưới 10°C trước khi xử lý bằng dung dịch axit clohydric (HCl) 6,0N trong nước (450 mL, 2,70 mol, 9,0 đương lượng) trong khi giữ nhiệt độ bên trong ở dưới 10°C. Sau đó làm ấm từ từ hỗn hợp phản ứng tạo thành đến nhiệt độ trong phòng và thêm từ từ lượng bổ sung dung dịch axit clohydric (HCl) 6,0N trong nước (1050 mL, 6,30 mol, 21,0 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 8 giờ qua phễu bổ sung. Khi phản ứng đã hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, sau đó làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống 0°C trước khi xử lý bằng dung dịch natri hydroxit 30% trong nước (NaOH, 860 mL, 8,57 mmol, 28,6 đương lượng) trong khi giữ nhiệt độ bên trong ở dưới 10°C. Sau đó, làm ấm hỗn hợp phản ứng tạo thành đến nhiệt độ môi trường trước khi thêm natri bicacbonat rắn (NaHCO₃, 85,0 g, 1,01 mol, 3,37 đương lượng) trong 1 giờ. Sau đó chiết hỗn hợp này bằng EtOAc (2 x 1,2 L), và rửa pha hữu cơ đã gộp lại bằng dung

dịch natri clorua 16% trong nước (2 x 800 mL) và cô còn xấp xỉ 1,0 L bằng cách chưng cất chân không. Thêm *n*-heptan (2,1 L) vào phần cặn này, và cô hỗn hợp tạo thành này còn 1,0 L bằng cách chưng cất chân không. Thêm *n*-heptan (2,1 L) vào hỗn hợp đã cô. Sau đó cô thể huyền phù đặc màu trắng tạo thành còn 1,0 L bằng cách chưng cất chân không. Sau đó, thêm metyl *tert*-butyl ete (MTBE, 1,94 L) vào thể huyền phù đặc màu trắng. Gia nhiệt hỗn hợp màu trắng đục này đến 40°C thu được dung dịch trong. Cô dung dịch tạo thành đến khi còn khoảng 1,0 L bằng cách chưng cất chân không. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Thu kết tủa màu trắng bằng cách lọc, rửa bằng *n*-heptan (400 mL) và làm khô trên máy lọc trong môi trường khí nitơ đồng thời hút chân không thu được (3-fluoro-2-(trifluoromethyl)pyridin-4-yl) (1,4-dioxo-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (7, 78,3 g, 86,8 g theo lý thuyết, 90,2%) là chất rắn màu trắng nhạt. Dữ liệu của hợp chất 7: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,68 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4,69$ Hz, 1H, NCH trong pyridin), 7,97 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,69$ Hz, $^4J_{\text{HF}} = 4,69$ Hz, 1H, NCCH trong pyridin), 3,92 (br s, 2H, một trong các nhóm NCH₂ trong vòng piperidin, một trong các nhóm NCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí trục), 3,54 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,15$ Hz, 2H, một trong các nhóm NCH₂ trong vòng piperidin, một trong các nhóm NCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí xích đạo), 2,48 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,44$ Hz, 2H, NCCH₂), 2,34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,15$ Hz, 2H, NCCH₂) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-C=O), 151,26 (d, $^1J_{\text{CF}} = 266,89$ Hz, C-F), 146,90 (d, $^4J_{\text{CF}} = 6,05$ Hz, NCH trong pyridin), 135,56 (C-C=O), 134,78 -135,56 (m, NCCF₃), 128,27 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7,19$ Hz, NCCH trong pyridin), 119,52 (d × vạch tư, $^1J_{\text{CF}} = 274,38$ Hz, $^3J_{\text{CF}} = 4,89$ Hz, CF₃), 45,10 (NC trong vòng piperidin) ppm, một cacbon (NCC trong vòng piperidin) bị mất do chồng lên (CD₃)₂SO; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ -64,58 (d, $^4J_{\text{FF}} = 15,85$ Hz, F₃C), -128,90 (d × vạch tư, $^4J_{\text{FF}} = 15,85$ Hz, $^4J_{\text{FH}} = 4,05$ Hz, FC) ppm; C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (phân tử lượng, 290,21), LCMS (EI) *m/e* 291,1 (M⁺ + H).

Ví dụ 4. Tổng hợp *tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat

Sơ đồ IV



1-benzhydrylazetididin-3-ol hydrochlorua (16). Dung dịch chứa diphenylmetanamin (2737 g, 15,0 mol, 1,04 đương lượng) trong metanol (MeOH, 6 L) được xử lý bằng 2-(clometyl)oxiran (1330 g, 14,5 mol) từ phễu bổ sung ở nhiệt độ môi trường. Trong khi thêm lúc đầu, chú ý sự thu nhiệt nhẹ. Khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 ngày trước khi làm ấm đến nhiệt độ hồi lưu trong 3 ngày nữa. Khi phân tích TLC chỉ ra rằng phản ứng được cho là đã hoàn thành, đầu tiên làm nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng và sau đó đến 0 – 5°C trong bể nước đá. Thu các chất rắn bằng cách lọc và rửa bằng axeton (4 L) thu được mẻ thứ nhất chứa sản phẩm thô mong muốn (1516 g). Cô dịch lọc dưới áp suất giảm và pha loãng chất bán rắn thu được với axeton (1 L). Sau đó, thu chất rắn này bằng cách lọc để thu mẻ thứ hai chứa sản phẩm thô mong muốn (221 g). Sản phẩm thô, 1-benzhydrylazetididin-3-ol hydrochlorua (1737 g, 3998,7 g theo lý thuyết, hiệu suất 43,4%), được thấy là đủ độ tinh khiết để được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,28 (br, d, 1H), 7,7 (m, 5H), 7,49 (m, 5H), 6,38 (d, 1H), 4,72 (br, s, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,12 (m, 2H), 3,85 (m, 2H) ppm; $C_{16}H_{18}ClNO$ (phân tử lượng 275,77; $C_{16}H_{17}NO$ là công thức của bazơ tự do, phân tử lượng, 239,31), LCMS (EI) m/e 240 ($M^+ + H$).

tert-butyl 3-hydroxyazetididin-1-carboxylat (17). Khuấy thể huyền phù chứa 1-benzhydrylazetididin-3-ol hydrochlorua (625 g, 2,27 mol) trong dung dịch natri cacbonat 10% trong nước (Na_2CO_3 , 5 L) và diclometan (CH_2Cl_2 , 5 L) ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi tất cả các chất rắn được hòa tan. Tách hai lớp ra, và chiết lớp nước bằng diclometan (CH_2Cl_2 , 2 L). Làm khô các dịch chiết hữu cơ đã gộp lại

trên natri sulfat (Na_2SO_4) và cô dưới áp suất giảm. Sau đó, hòa tan bazơ tự do 1-benzhydrylazetidin-3-ol thô tạo thành trong THF (6 L) và đặt dung dịch này vào trong bình chịu áp suất Parr lớn. Thêm di-*tert*-butyl dicacbonat (BOC_2O , 545 g, 2,5 mol, 1,1 đương lượng) và paladi (Pd) 20% trên cacbon (125 g, độ ẩm 50%) vào bình chịu áp suất Parr này. Nạp khí hydro (H_2) đến áp suất 30 psi vào bình và khuấy trong môi trường khí hydro ổn định (bình được nạp lại ba lần giữ áp suất ở 30 psi) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 18 giờ. Khi HPLC chỉ ra rằng phản ứng đã hoàn thành (không còn hydro sinh ra), lọc hỗn hợp phản ứng qua đệm Xelit và rửa đệm Xelit bằng THF (4 L). Cô các dịch lọc dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi và nạp phần còn lại vào cột Biotage 150 với lượng tối thiểu diclometan (CH_2Cl_2). Rửa giải cột này bằng etyl axetat 20 – 50% trong *n*-heptan và thu gom và gộp các phân đoạn chứa sản phẩm tinh khiết mong muốn, *tert*-butyl 3-hydroxyazetidin-1-carboxylat. Loại bỏ các dung môi dưới áp suất giảm thu được *tert*-butyl 3-hydroxyazetidin-1-carboxylat (357 g, 393,2 g theo lý thuyết, hiệu suất 90,8%) là dầu không màu, mà hóa rắn khi để ở nhiệt độ môi trường trong chân không. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ 4,56 (m, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 1,43 (s, 9H) ppm.

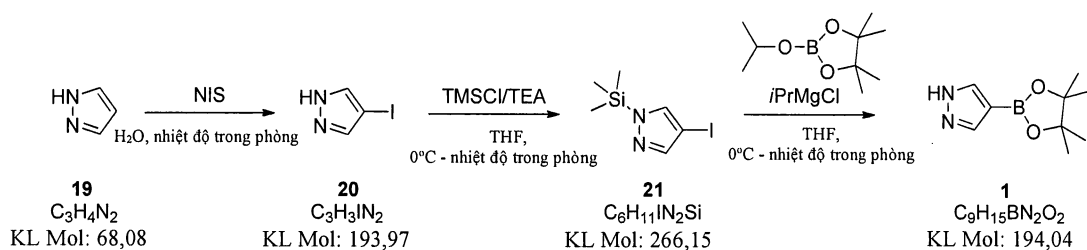
***tert*-butyl 3-oxoazetidin-1-carboxylat (18).** Làm lạnh dung dịch chứa *tert*-butyl 3-hydroxyazetidin-1-carboxylat (50 g, 289 mmol) trong etyl axetat (400 mL) đến 0°C . Sau đó, xử lý dung dịch tạo thành bằng TEMPO rắn (0,5 g, 3,2 mmol, 0,011 đương lượng) và dung dịch chứa kali bromua (KBr, 3,9 g, 33,2 mmol, 0,115 đương lượng) trong nước (60 mL) ở nhiệt độ $0 - 5^\circ\text{C}$. Trong khi giữ nhiệt độ phản ứng trong khoảng $0 - 5^\circ\text{C}$, thêm dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (NaHCO_3 , 450 mL) và dung dịch nước natri hypoclorit (NaClO , clo chiếm 10 - 13%, 450 mL). Khi thêm dung dịch natri hypoclorit vào, màu của hỗn hợp phản ứng thay đổi ngay lập tức. Khi thêm lượng bổ sung dung dịch natri hypoclorit vào, màu của hỗn hợp phản ứng dần dần biến mất. Khi phân tích TLC chỉ ra rằng toàn bộ nguyên liệu ban đầu được tiêu thụ, thì màu của hỗn hợp phản ứng không còn thay đổi nữa. Sau đó, pha loãng hỗn hợp phản ứng với etyl axetat (EtOAc , 500 mL) và hai lớp được tách ra. Rửa lớp hữu cơ bằng nước (500 mL) và dung dịch nước natri clorua bão hòa (500 mL) và làm khô bằng natri sulfat (Na_2SO_4). Sau đó, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, *tert*-butyl 3-oxoazetidin-1-carboxylat (48 g, 49,47 g

theo lý thuyết, hiệu suất 97%), sản phẩm này được thấy là đủ độ tinh khiết và được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,65 (s, 4H), 1,42 (s, 9H) ppm.

***tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (2).** Cho diethyl xyanometyl phosphat (745 g, 4,20 mol, 1,20 đương lượng) và tetrahydrofuran khan (THF, 9 L) vào bình bốn cổ được trang bị hộp đo nhiệt, phễu bổ sung và ống bảo vệ nitơ ở nhiệt độ trong phòng. Làm lạnh dung dịch này bằng bể nước đá-metanol xuống -14°C và thêm dung dịch kali *tert*-butoxit (*t*-BuOK) 1,0M trong tetrahydrofuran khan (THF, 3,85 L, 3,85 mol, 1,1 đương lượng) vào trong hơn 20 phút trong khi giữ nhiệt độ phản ứng dưới -5°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành trong thời gian 3 giờ ở -10°C và thêm dung dịch chứa 1-*tert*-butoxycarbonyl-3-azetidinon (600 g, 3,50 mol) trong tetrahydrofuran khan (THF, 2 L) trong thời gian 2 giờ trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới -5°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ từ -5 đến -10°C trong thời gian 1 giờ và sau đó làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau đó, pha loãng hỗn hợp phản ứng với nước (4,5 L) và dung dịch nước natri clorua bão hòa (NaCl , 4,5 L) và chiết bằng etyl axetat (EtOAc , 2 x 9 L). Rửa lớp hữu cơ đã gộp lại bằng nước muối (6 L) và làm khô bằng natri sulfat khan (Na_2SO_4). Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và pha loãng phần cặn bằng diclometan (CH_2Cl_2 , 4 L) trước khi cho hấp thụ trên silica gel (SiO_2 , 1,5 kg). Tinh chế sản phẩm thô, mà đã cho hấp thụ trên silica gel, bằng sắc ký cột nhanh (SiO_2 , 3,5 kg, rửa giải bằng gradient 0 – 25% EtOAc /hexan) thu được *tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (**2**, 414,7 g, 679,8 g theo lý thuyết, hiệu suất 61%) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **2**: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 5,40 (m, 1H), 4,70 (m, 2H), 4,61 (m, 2H), 1,46 (s, 9H) ppm; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (phân tử lượng, 194,23), LCMS (EI) m/e 217 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Ví dụ 5. Tổng hợp 4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol

Sơ đồ V



4-Iodopyrazol (20). Nạp pyrazol (1, 450 g, 6,62 mol) và tetrahydrofuran (THF, 5 L) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu được trang bị cửa dẫn khí nitơ vào, phễu bổ sung, hộp đo nhiệt, và thanh khuấy cơ học. Sau đó làm nguội hỗn hợp này đến 10°C và thêm từng phần *N*-iodosuccinimit (NIS, 1490 g, 6,62 mol, 1,0 đương lượng) dưới dạng chất rắn vào hỗn hợp này ở nhiệt độ xấp xỉ 10°C. Sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 1 giờ (phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường, có thể cần thời gian phản ứng dài hơn). Sau đó lọc hỗn hợp này và loại bỏ THF dưới áp suất giảm. Tạo huyền phù phần cặn trong etyl axetat (6 L) và lọc các chất không tan. Sau đó, rửa dịch lọc sẫm màu bằng dung dịch nước natri thiosulfat bão hòa (2 x 3 L) (lớp hữu cơ sáng dần thành màu vàng nhạt), nước (2 x 3 L), và nước muối (2 L). Sau đó làm khô lớp hữu cơ tạo thành bằng natri sulfat, lọc, và cô dưới áp suất giảm thu được 4-iodopyrazol (1138 g, 1284,1 g theo lý thuyết, 88,6%) là chất rắn có màu từ trắng sang vàng nhạt sau khi được làm khô trong lò chân không ở nhiệt độ xấp xỉ 30°C qua đêm. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,17 (bs, 1H), 7,93 (bs, 1H), 7,55 (bs, 1H) ppm; $\text{C}_3\text{H}_3\text{IN}_2$ (phân tử lượng, 193,97), LCMS (EI) m/e 195 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

1-trimethylsilyl-4-iodopyrazol (21). Nạp 4-iodopyrazol (200 g, 1,03 mol) và THF (2 L) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu được trang bị thiết bị ngưng tụ hồi lưu, cửa dẫn khí nitơ vào, thanh khuấy cơ học, và hộp đo nhiệt. Thêm triethylamin (TEA, 158 mL, 1,13 mol, 1,1 đương lượng) vào dung dịch này và làm lạnh dung dịch tạo thành đến 0°C trong bể nước đá-nước muối. Thêm clotrimetylsilan (TMS-Cl, 137 mL, 1,08 mol, 1,05 đương lượng) vào dung dịch này đồng thời khuấy mạnh để cho nhiệt độ đạt tới 18°C. (Dung dịch phản ứng trở nên rất đặc và khó khuấy, nhưng lại trở nên dễ khuấy hơn sau một thời gian). Khi quá trình tỏa nhiệt giảm bớt, loại bỏ bể làm lạnh và làm ấm phản ứng đến nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo phản ứng được phân tích sắc ký khí (GC) và thấy là dường như đã hoàn thành sau khoảng 1 giờ (việc lấy mẫu phản ứng phải được tiến hành không có mặt không khí và pha loãng

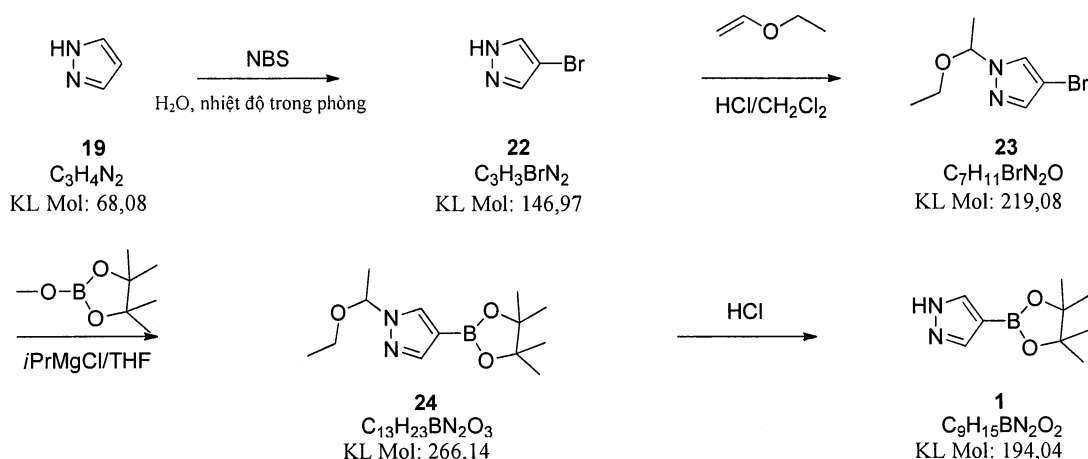
bằng dung môi khan để tránh thủy phân TMS). Sau đó, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng *n*-heptan (2 L) trước khi lọc trong môi trường khí nitơ. Loại bỏ dung môi khỏi dịch lọc dưới áp suất giảm thông khí với thiết bị làm bay hơi kiểu quay chứa khí nitơ. Pha loãng dầu còn lại với *n*-heptan (1 L) và cô lại. Nếu tạo thành các chất rắn khi thêm *n*-heptan, thì cần phải lọc lần thứ hai. Sau đó chưng cất phần cặn dưới áp suất giảm (70 - 90°C ở khoảng 0,5 Torr (1 Torr $\approx$ 1mm Hg)) bằng cách sử dụng Kugelrohr thu được 1-trimetylsilyl-4-iodopyrazol (263 g, 274,1 g theo lý thuyết, 96%) là dầu không màu. Phải giữ chất này trong môi trường khí nitơ ở tất cả các lần điều chế bởi vì nhóm TMS thủy phân nhanh chóng. Tiếp đó, thấy rằng có thể điều chế được 1-trimetylsilyl-4-iodopyrazol bằng cách gia nhiệt iodopyrazol với 2 đương lượng hexametyldisilazan trong 1 giờ.

4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (1). Nạp 1-trimetylsilyl-4-iodopyrazol (225,1 g, 0,85 mol) và THF (2200 mL) ở nhiệt độ môi trường vào bình cầu được trang bị thanh khuấy cơ học, cửa dẫn khí nitơ vào, phễu bổ sung và hộp đo nhiệt. Làm lạnh hỗn hợp này đến xấp xỉ -6°C trong bể nước đá/muối/nước muối trước khi thêm dung dịch chứa isopropyl magie clorua trong THF (dung dịch 2M trong THF, 510 mL, 1,02 mol, 1,2 đương lượng) vào với tốc độ sao cho nhiệt độ bên trong không vượt quá 0°C. Mức độ trao đổi kim loại/halogen được kiểm tra theo phương pháp GC và được thấy là hoàn thành sau khoảng 10 phút. Sau đó, thêm 2-isopropoxy-4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan (isopropylpinacolborat, 347 mL, 1,7 mol, 2,0 đương lượng) vào dung dịch màu cam nâu, đầu tiên là thêm từ từ, giữ nhiệt độ dưới 0°C và sau đó là khá nhanh sau khi đã thêm khoảng một nửa hợp chất này để cho nhiệt độ đạt tới 5°C (dung dịch phản ứng trở nên khá đặc và sau đó từ từ loãng dần). Sau đó, khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 10 phút trước khi làm ấm đến nhiệt độ môi trường trong thời gian 1 giờ và khuấy ở nhiệt độ môi trường thêm 1 giờ nữa. Làm nguội hỗn hợp phản ứng đến xấp xỉ 6°C và thêm dung dịch nước amoni clorua bão hòa (NH₄Cl, 2,2 L) vào với nhiệt độ tăng lên đến 25°C. Khuấy hỗn hợp này trong thời gian 5 phút trước khi pha loãng bằng toluen (10 L). Tách các lớp (lượng lớn chất rắn có mặt trong lớp nước) và sau đó rửa lớp hữu cơ bằng nước (6 x 2,2 L) và nước muối (2 x 2,2 L) trước khi làm khô bằng natri sulfat (Na₂SO₄). Loại bỏ chất phản ứng, natri sulfat (Na₂SO₄), bằng cách lọc và cô dung dịch này dưới áp suất giảm.

Làm bay hơi đồng thời toluen còn lại với *n*-heptan thu được 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (**1**, 90,3 g, 164,9 g theo lý thuyết, 54,8%) là chất rắn màu trắng. Dữ liệu của hợp chất **1**: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,08 (bs, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 1,23 (s, 12H) ppm; $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{BN}_2\text{O}_2$ (phân tử lượng, 194,04), LCMS (EI) m/e 195 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ví dụ 6. Tổng hợp 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol theo cách khác

Sơ đồ VI



4-bromopyrazol (22**).** Tạo huyền phù pyrazol (**19**, 34,0 g, 0,5 mol) và NBS (89,0 g, 0,5 mol, 1,0 đương lượng) trong nước (625 ml) ở nhiệt độ môi trường. Khuấy thể huyền phù tạo thành ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Sau đó chiết hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (2 x 100 mL). Rửa các dịch chiết EtOAc đã gộp lại bằng dung dịch nước $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ và nước muối, làm khô bằng Na_2SO_4 , và cô dưới áp suất giảm thu được 4-bromopyrazol thô (72,0 g, 73,5 g theo lý thuyết, hiệu suất 98%) là các chất rắn màu trắng (độ tinh khiết theo phân tích GC: >98%), chất rắn này được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp.

4-brom-1-(etoxyetyl)-1*H*-pyrazol (23**).** Cho dung dịch chứa HCl 3,1M trong dioxan (4 mL) và etyl vinyl ete (41 g, 0,569 mol, 1,2 đương lượng) ở nhiệt độ môi trường vào dung dịch chứa 4-bromopyrazol (70,0 g, 0,476 mol) trong CH_2Cl_2 (600 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 3 giờ. Dừng phản ứng bằng dung dịch nước NaHCO_3 và tách hai lớp ra. Rửa lớp hữu cơ bằng nước, làm khô bằng Na_2SO_4 , và cô dưới áp suất giảm đến khô thu được 4-

brom-1-(etoxyetyl)-1*H*-pyrazol (113 g, 104,3 g theo lý thuyết, hiệu suất 97%) là dầu (độ tinh khiết theo phân tích GC: 89%), dầu này được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp.

1-(etoxyetyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (24).

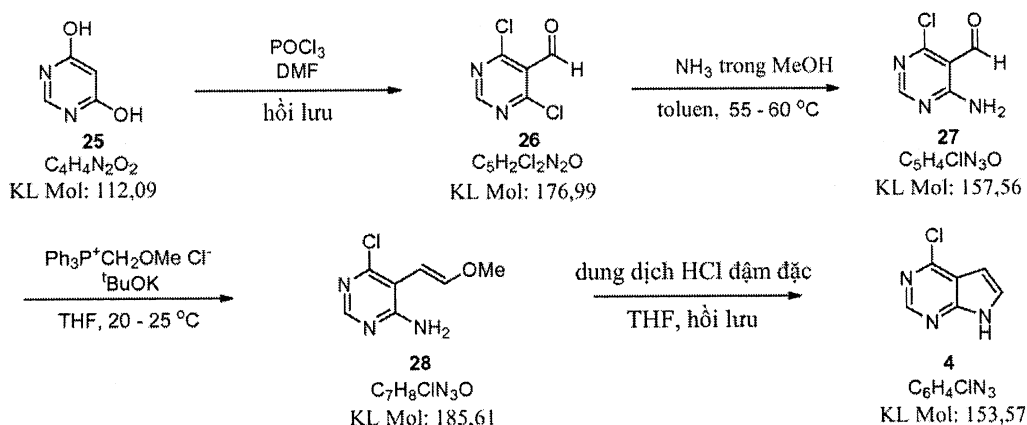
Cho 4-brom-1-(etoxyetyl)-1*H*-pyrazol (6,15 g, 28 mmol) ở nhiệt độ môi trường vào 100 ml dung dịch chứa *i*PrMgCl.LiCl (50 mmol, 1,8 đương lượng) trong THF. Khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 12 giờ và sau đó làm lạnh đến -20°C. Sau đó thêm metoxy pinacolborat (10,6 g, 67 mmol, 2,4 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -20°C. Khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ 0 - 10°C trong thời gian 1 giờ. Thêm dung dịch nước NH₄Cl vào để dừng phản ứng. Sau đó chiết hỗn hợp này bằng ete dầu mỏ (PE). Rửa các dịch chiết PE được gộp lại bằng NaHCO₃ bão hòa, làm khô bằng Na₂SO₄ và cô dưới áp suất giảm. Tinh chế sản phẩm thô trong PE thu được 1-(etoxyetyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (**24**, 4,2 g, 7,45 g theo lý thuyết, hiệu suất 56,4%) là chất rắn có màu trắng đến trắng nhạt (độ tinh khiết theo phân tích GC: 99%). Dữ liệu của hợp chất **24**: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8,09 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 5,55 (q, 1H, *J* = 6,1 Hz), 3,37 (dq, 1H, *J* = 7,1, 9,6 Hz), 3,12 (dq, 1H, *J* = 7,0, 9,7 Hz), 1,56 (d, 3H, *J* = 6,0 Hz), 1,24 (s, 12H), 1,00 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz) ppm; C₁₃H₂₃BN₂O₃ (phân tử lượng, 266,14), LCMS (EI) *m/e* 267 (M⁺ + H).

4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (1). Cho từ từ dung dịch chứa HCl trong MTBE (25,0 kg, HCl chiếm 20 – 30%) ở nhiệt độ 0 – 5°C vào hỗn hợp bao gồm 2,3-dimetylbutan-2,3-diol (25,0 kg, 211,6 mol) và 1-(1-etoxyetyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (**24**, 55,0 kg, 206,7 mol) trong 1,2-dicloetan (750 kg). Sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ 10 – 20°C trong thời gian từ 3 – 5 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng khử bảo vệ chọn lọc như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC (**1**: dưới 1%), hỗn hợp phản ứng được loại khí và nạp lại khí nitơ trước khi làm lạnh đến -15°C. Sau đó thêm trietylamin (TEA, 30,0 kg, 296,5 mol) vào hỗn hợp phản ứng đã làm lạnh này để điều chỉnh độ pH đến 7 – 8. Sau đó từ từ làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ môi trường trước khi xử lý bằng nước (150 kg). Tách hai pha này và rửa lớp hữu cơ bằng nước muối (60 kg) và làm khô bằng natri sulfat (Na₂SO₄). Loại bỏ chất khô,

natri sulfat (Na_2SO_4), bằng cách lọc và cô dung dịch tạo thành dưới áp suất giảm ở nhiệt độ $40 - 50^\circ\text{C}$ thành dầu đặc. Làm ấm phần cặn đến $60 - 70^\circ\text{C}$ và pha loãng bằng ete dầu mỏ (100 kg) ở cùng nhiệt độ này. Sau đó, làm nguội từ từ hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ môi trường và sau đó đến -5°C và khuấy ở cùng nhiệt độ này trong thời gian 3 giờ. Thu gom các chất rắn bằng cách li tâm và làm khô ở nhiệt độ $50 - 60^\circ\text{C}$ trong chân không thu được sản phẩm thô mong muốn (**1**, 33,75 kg, 40,11 kg theo lý thuyết, 84,1%). Sau đó tạo huyền phù sản phẩm thô mong muốn trong 1,2-dicloetan (30 kg) và gia nhiệt hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ hồi lưu cho đến khi tạo thành dung dịch trong. Sau đó thêm ete dầu mỏ (150 kg) ở cùng nhiệt độ vào dung dịch nóng này. Sau đó làm nguội từ từ hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ môi trường và sau đó đến -5°C và khuấy ở nhiệt độ này trong 3 giờ. Thu các chất rắn bằng cách li tâm và làm khô trong chân không ở nhiệt độ $50 - 60^\circ\text{C}$ thu được 4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (**1**, 31,0 kg, 40,11 kg theo lý thuyết, 77,3%) là chất rắn màu trắng, mà giống với chất được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp được mô tả trong Ví dụ 5 nêu trên về mọi khía cạnh có thể so sánh được.

Ví dụ 7. Tổng hợp 4-clo-7H-[pyrolo[2,3-d]pyrimidin

Sơ đồ VII



4,6-diclopyrimidin-5-carbaldehyt (26). Nạp phospho oxyclorua (POCl_3 , 1 L, 10,572 mol, 4,82 đương lượng) vào bình 4 cổ dung tích 5 L được trang bị thanh khuấy cơ học, phễu bổ sung, thiết bị ngưng tụ, cặp nhiệt điện, và cánh quét N_2 vào dung dịch nước rửa NaOH, và làm lạnh hỗn hợp trong bể muối/đá. Sau đó thêm từng giọt *N,N*-dimetylformamit (DMF, 320 mL, 4,138 mol, 1,85 đương lượng) ở

nhiệt độ $0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ vào bình này. Sau khi thêm xấp xỉ 100 mL DMF trong thời gian xấp xỉ 0,5 giờ, xuất hiện hiện tượng kết tinh và tăng nhiệt độ phản ứng từ 0 đến 10°C . Dừng việc thêm DMF và làm lạnh lại hỗn hợp này đến nhiệt độ xấp xỉ 2°C . Thêm DMF còn lại vào trong thời gian hơn 2,5 giờ ở dưới 8°C . Thể huyền phù trở nên rất đặc khiến cho việc khuấy khó khăn. Khi thêm DMF xong, khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ $3 - 5^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 0,5 giờ. Thêm từng phần nhỏ 4,6-dihydroxypyrimidin (250 g, 2,232 mol) dưới dạng chất rắn vào hỗn hợp đó. Sau khi thêm được khoảng một phần ba 4,6-dihydroxypyrimidin vào, hỗn hợp phản ứng trở nên lưu động hơn, và xảy ra hiện tượng tỏa nhiệt chậm với nhiệt độ phản ứng tăng đến xấp xỉ 12°C trong thời gian 0,5 giờ. Thêm từng phần nhỏ 4,6-dihydroxypyrimidin còn lại vào trong thời gian 0,25 giờ trong khi nhiệt độ phản ứng tăng từ 12 đến 27°C . Giữ nhiệt độ phản ứng ở nhiệt độ $25 - 27^{\circ}\text{C}$ đồng thời làm nguội gián đoạn trong khoảng thời gian mà thể huyền phù màu vàng trở nên loãng hơn, sau đó lại đặc. Sau khi hiện tượng tỏa nhiệt giảm bớt trong khoảng 1 giờ, gia nhiệt từ từ hỗn hợp phản ứng. Ở khoảng 55°C , hỗn hợp phản ứng trở nên cực kỳ đặc và xảy ra hiện tượng tỏa nhiệt nhẹ lần thứ hai. Loại bỏ lớp phủ gia nhiệt trong khi nhiệt độ phản ứng tiếp tục tăng đến khoảng 63°C và giữ ở nhiệt độ này trong vài phút trước khi giảm xuống. Lại tiếp tục gia nhiệt hỗn hợp này cho đến khi hồi lưu nhẹ (khoảng 100°C). Ở khoảng 95°C , khí HCl bắt đầu bay hơi khá nhanh và ổn định và hỗn hợp phản ứng trở nên loãng và sẫm màu dần. Sau khoảng 0,5 giờ, hỗn hợp chuyển thành dung dịch màu nâu trong suốt có nhiệt độ hồi lưu tăng từ từ đến 115°C trong thời gian 1,25 giờ. Sau tổng thời gian 2,5 giờ ở nhiệt độ hồi lưu, làm nguội hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ môi trường và khuấy qua đêm ở nhiệt độ môi trường. Loại bỏ lượng dư POCl_3 (càng nhiều càng tốt) dưới áp suất giảm (nhiệt độ bể là $45 - 50^{\circ}\text{C}$). Rót rất chậm dầu màu nâu sẫm còn lại vào H_2O lạnh (5 L) trong phễu tách dung tích 20 L, thêm nước đá vào nếu cần để duy trì hỗn hợp nước này ở gần với nhiệt độ trong phòng. Chiết hỗn hợp nước này bằng EtOAc (2 x 3 L tiếp đó là 1 x 2 L). Rửa các dịch chiết EtOAc đã gộp lại bằng H_2O (2 x 2,5 L), dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (1 L), nước muối (1 L), làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc, và cô dưới áp suất giảm (nhiệt độ bể là 35°C) thu được 4,6-diclopyrimidin-5-carbaldehyt thô (270 g, 395 g theo lý thuyết, 68,4%) là các chất rắn màu vàng cam. Tinh chế 20 g phần chất thô này bằng phương pháp chưng cất Kugelrohr (nhiệt độ lò là $90 -$

100°C, 225 mTorr) thu được 15,3 g 4,6-diclopyrimidin-5-carbaldehyt tinh khiết là chất rắn màu trắng, chất này chuyển sang màu vàng khi để yên ở nhiệt độ trong phòng. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10,46 (s, 1H), 8,89 (s, 1H) ppm.

4-amino-6-clopyrimidin-5-carbaldehyt (27). Thêm dung dịch chứa NH_3 7M trong MeOH (265 mL, 1,855 mol, 2,0 đương lượng) trong 1,25 giờ vào dung dịch chứa 4,6-diclopyrimidin-5-carbaldehyt (163,7 g, 0,9301 mol) trong toluen (3 L) ở nhiệt độ môi trường. Nhiệt độ phản ứng tăng từ từ 20 đến 26°C và hình thành thể huyền phù màu vàng. Làm lạnh nhẹ để duy trì nhiệt độ phản ứng ở dưới 26°C. Khuấy thể huyền phù này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 3,5 giờ trước khi thu các chất rắn bằng cách lọc. Rửa các chất rắn này bằng EtOAc (1 L). Cô dịch lọc dưới áp suất giảm, và nghiền nhỏ các chất rắn này với toluen và *n*-heptan (tỷ lệ thể tích/thể tích 2:1, 600 mL), lọc và làm khô thu được 71,1 g 4-amino-6-clopyrimidin-5-carbaldehyt là chất rắn màu vàng. Chất rắn ban đầu được lọc từ hỗn hợp phản ứng chứa lượng bổ sung 4-amino-6-clopyrimidin-5-carbaldehyt. Chiết sản phẩm từ chất rắn đã lọc này bằng cách khuấy trong EtOAc (1,25 L) trong thời gian 1,5 giờ, lọc, sau đó khuấy trong THF (750 mL) trong thời gian 1 giờ và khuấy lại. Cô cả dịch lọc EtOAc và THF dưới áp suất giảm, và nghiền nhỏ các chất rắn thu được với toluen và *n*-heptan (tỷ lệ thể tích/thể tích 2:1, 450 mL), lọc và làm khô thu được 44,1 g 4-amino-6-clopyrimidin-5-carbaldehyt bổ sung là chất rắn màu vàng. Tổng hiệu suất kết hợp của 4-amino-6-clopyrimidin-5-carbaldehyt (115,2 g, 146,5 g theo lý thuyết) là 78,6%. $^1\text{HNMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,23 (s, 1H), 8,71 (bs, 1H), 8,55 (bs, 1H), 8,39 (s, 1H) ppm; $\text{C}_5\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}$ (phân tử lượng, 157,56), LCMS (EI) m/e 158 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

6-clo-5-(2-metoxivinyl)pyrimidin-4-ylamin (28). Làm lạnh thể huyền phù chứa (metoxymetyl)triphenylphosphoni clorua (276,0 g, 0,807 mol, 1,1 đương lượng) trong THF (1,5 L) trong bể nước đá/muối đến -2°C và thêm kali *tert*-butoxit (KO^tBu) 1M trong THF (807 mL, 0,807 mol, 1,1 đương lượng) trong thời gian 1,5 giờ ở -2 đến -3°C vào hỗn hợp. Khuấy hỗn hợp màu đỏ cam đậm tạo thành ở -2 đến -3°C trong thời gian 1 giờ. Sau đó, thêm từng phần nhỏ 4-amino-6-clopyrimidin-5-carbaldehyt (115,2 g, 0,7338 mol, 1,0 đương lượng) dưới dạng chất rắn vào hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng THF (200 mL) để rửa vật chứa và phễu. Trong khi

thêm, nhiệt độ phản ứng tăng lên từ -3 đến 13°C và hỗn hợp phản ứng chuyển sang màu nâu. Khi nhiệt độ phản ứng giảm xuống 10°C, lấy bể làm lạnh ra và để hỗn hợp phản ứng ấm lên đến nhiệt độ môi trường và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 42 giờ. Làm nguội hỗn hợp phản ứng đến -2°C trước khi dừng phản ứng bằng cách thêm từ từ dung dịch nước NH₄Cl bão hòa (750 mL). Cô hỗn hợp này dưới áp suất giảm để loại bỏ hầu hết THF. Phân bố phần cạn giữa EtOAc (3 L) và H₂O (1 L). Lọc pha hữu cơ để loại bỏ chất không tan ở bề mặt, sau đó chiết bằng HCl 2N (4 x 250 mL) sau đó bằng HCl 3N (2 x 250 mL). Chiết trở lại các phần dịch chiết HCl đã gộp lại bằng EtOAc (500 mL) sau đó lọc qua Xelit để loại bỏ chất không tan. Làm lạnh dịch lọc trong bể nước nước đá/muối, điều chỉnh độ pH đến 8 bằng dung dịch nước NaOH 6N và chiết bằng EtOAc (3 x 1 L). Rửa các dịch chiết EtOAc đã gộp lại bằng nước muối (1 L), làm khô bằng Na₂SO₄, khuấy với than hoạt tính (10 g) và silica gel (10 g) trong thời gian 1 giờ. Lọc hỗn hợp này qua Xelit, rửa đệm Xelit bằng EtOAc (1 L). Cô dịch lọc, làm bay hơi đồng thời EtOAc còn lại với *n*-heptan (500 mL). Bơm chất rắn màu nâu vàng thu được trong chân không cao trong thời gian 2 giờ thu được 6-clo-5-(2-metoxystyryl)pyrimidin-4-ylamin thô (72,3 g, 136,2 g theo lý thuyết, 53,1%). Sản phẩm thô mong muốn được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp. Tinh chế mẫu sản phẩm thô (2,3 g) bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng 0 – 35% EtOAc/*n*-heptan thu được 1,7 g 6-clo-5-(2-metoxystyryl)pyrimidin-4-ylamin tinh khiết là chất rắn màu trắng, được phát hiện là hỗn hợp các đồng phân *E/Z* tỷ lệ 1/2. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) của đồng phân *E*: δ 8,02 (s, 1H), 7,08 (bs, 2H), 6,92 (d, 1H, *J* = 13,1), 5,35 (d, 1H, *J* = 13,0 Hz), 3,68 (s, 3H) ppm và của đồng phân *Z*: δ 8,06 (s, 1H), 7,08 (bs, 2H), 6,37 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 5,02 (d, 1H, *J* = 6,7 Hz), 3,69 (s, 3H) ppm; C₇H₈ClN₃O (phân tử lượng, 185,61), LCMS (EI) *m/e* 186/188 (M⁺ + H).

4-clo-7H-[pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (4). Cho HCl đậm đặc (5 mL) vào dung dịch chứa 6-clo-5-(2-metoxystyryl)pyrimidin-4-ylamin thô (70,0 g, 0,3784 mol) trong THF (700 mL) và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng tạo thành đến nhiệt độ hồi lưu trong thời gian 7,5 giờ. Khi làm ấm bằng ánh sáng, thể huyền phù được tạo thành, thể huyền phù này lại dần dần tan. Khi phản ứng được cho là hoàn thành như được kiểm tra bằng phương pháp HPLC, tiến hành làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến nhiệt

độ môi trường và khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Thêm NaHCO_3 (15 g) rắn vào hỗn hợp phản ứng và khuấy hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 1 giờ. Thêm than hoạt tính (7 g), silica gel (7 g) và Na_2SO_4 (20 g) vào và gia nhiệt hỗn hợp này đến 40°C trong thời gian 1 giờ. Sau đó làm nguội hỗn hợp này đến nhiệt độ môi trường và lọc qua Xelit, rửa đệm Xelit bằng THF (1 L). Cô dịch lọc dưới áp suất giảm và làm khô chất rắn tạo thành dưới áp suất giảm thu được 4-clo-7H-[pyrolo[2,3-d]pyrimidin thô (4, 58,1 g, 58,1 g theo lý thuyết, 100%) là chất rắn màu nâu vàng. Hòa tan sản phẩm thô mong muốn này trong EtOAc (1 L) ở nhiệt độ $50 - 55^\circ\text{C}$ và xử lý bằng than hoạt tính (3 g). Lọc hỗn hợp này trong khi còn ấm qua Xelit và rửa đệm Xelit bằng EtOAc ấm (250 mL). Cô dịch lọc đến khi còn khoảng 500 mL và để yên thể huyền phù thu được ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Sau đó, làm lạnh thể huyền phù này đến $0 - 5^\circ\text{C}$ trong thời gian 2 giờ trước khi thu các chất rắn bằng cách lọc. Làm khô các chất rắn thu được 4-clo-7H-[pyrolo[2,3-d]pyrimidin tinh khiết (4, 54,5 g, 58,1 g theo lý thuyết, 94%) là các tinh thể màu nâu vàng. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,58 (bs, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,69 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz), 6,59 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz) ppm; LCMS (EI) m/e 154/156 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ví dụ A: Thử nghiệm JAK Kinaza *in vitro*

Hợp chất có công thức I được thử nghiệm về hoạt tính ức chế của các đích JAK theo thử nghiệm *in vitro* sau đây được mô tả trong tài liệu của Park *et al.*, *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 94-104. Các miền xúc tác của JAK1 (a.a. 837-1142) và JAK2 (a.a. 828-1132) ở người với His-tag đầu N được biểu hiện bằng cách sử dụng baculovirus trong các tế bào côn trùng và được tinh chế. Hoạt tính xúc tác của JAK1 và JAK2 đã được thử nghiệm bằng cách đo mức phosphoryl hóa của peptit được biotinyl hóa. Peptit được phosphoryl hóa này được phát hiện nhờ phép đo phổ huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất (homogenous time resolved fluorescence - HTRF). Các chỉ số IC_{50} của các hợp chất được xác định cho từng kinaza trong 40 microL hỗn hợp phản ứng có chứa enzym, ATP và peptit 500 nM trong đệm Tris 50 mM (độ pH 7,8) với NaCl 100 mM, DTT 5 mM, và BSA 0,1 mg/ml (0,01%). Để đo các giá trị IC_{50} 1 mM, thì nồng độ ATP trong các phản ứng là 1 mM. Các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và sau đó dừng phản ứng bằng 20 μL EDTA 45 mM, SA-APC 300 nM, Eu-Py20 6 nM trong đệm thử nghiệm (của hãng Perkin Elmer, Boston, MA). Sự gắn kết với kháng thể

được đánh dấu Europi diễn ra trong 40 phút và tín hiệu HTRF được đo trên đầu đọc đĩa Fusion (của hãng Perkin Elmer, Boston, MA). Hợp chất có công thức I và muối axit adipic có giá trị IC_{50} ở mức $JAK1 \leq 5$ nM (đo tại ATP 1 mM) với tỷ lệ $JAK2/JAK1$ là > 10 (đo tại ATP 1 mM).

Ví dụ B: Thử nghiệm tế bào

Các dòng tế bào ung thư phụ thuộc vào các xytokin và do đó truyền tín hiệu JAK/STAT, để tăng trưởng, có thể được đặt vào đĩa với mật độ 6000 tế bào mỗi giếng (kiểu đĩa 96 giếng) trong RPMI 1640, FBS 10%, và xytokin thích hợp 1 nG/mL. Các hợp chất có thể được thêm vào các tế bào trong DMSO/môi trường (nồng độ cuối cùng DMSO 0,2%) và ủ trong 72 giờ ở 37°C, CO₂ 5%. Tác dụng của hợp chất đối với khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng Thử nghiệm khả năng sống của tế bào phát quang CellTiter-Glo (của hãng Promega) tiếp theo là phương pháp định lượng TopCount (của hãng Perkin Elmer, Boston, MA). Các tác dụng không nhắm đích tiềm tàng của các hợp chất này được đo song song bằng cách sử dụng một dòng tế bào dẫn truyền không phải JAK với chỉ báo thử nghiệm tương tự. Tất cả các thí nghiệm thường được thực hiện hai lần.

Các dòng tế bào ở trên cũng có thể được sử dụng để kiểm tra tác dụng của các hợp chất đối với quá trình phosphoryl hóa JAK kinaza hoặc các cơ chất xuôi dòng tiềm năng như các protein STAT, Akt, Shp2, hoặc Erk. Những thí nghiệm này có thể được thực hiện sau khi bỏ đối xytokin qua đêm, tiếp theo là ủ trước với hợp chất (2 giờ hoặc ngắn hơn) và kích thích bằng xytokin trong khoảng 1 giờ hoặc ngắn hơn. Sau đó, các protein này được chiết từ các tế bào và được phân tích bằng các phương pháp kỹ thuật quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này bao gồm phương pháp thẩm tách Western hay ELISA sử dụng các kháng thể có thể biệt hóa giữa protein được phosphoryl hóa và protein tổng số. Những thí nghiệm này có thể sử dụng các tế bào bình thường hoặc các tế bào ung thư để xem xét hoạt tính của các hợp chất về mặt sinh học sinh tồn của tế bào khối u hoặc về các yếu tố trung gian của bệnh viêm. Ví dụ, liên quan đến các yếu tố trung gian này, các xytokin như IL-6, IL-12, IL-23, hoặc IFN có thể được sử dụng để kích thích sự hoạt hóa của JAK dẫn đến sự phosphoryl hóa (các)protein STAT và có khả năng tiềm tàng dẫn đến các profin phiên mã (được đánh giá bằng thử nghiệm hoặc kỹ thuật qPCR) hoặc sự sản xuất và/hoặc tiết ra các protein, như IL-17. Khả năng của

các hợp chất để ức chế các tác động do trung gian xytokin gây ra có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật thông thường đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

Các hợp chất trong tài liệu này cũng có thể được thử nghiệm trong các mô hình tế bào được thiết kế để đánh giá sự hiệu nghiệm và hoạt tính của chúng chống lại các Jak đột biến, ví dụ, đột biến JAK2V617F được phát hiện trong các rối loạn tăng sinh tủy. Những thí nghiệm này thường sử dụng tế bào phụ thuộc xytokin thuộc dòng huyết học (ví dụ: BaF/3) mà các JAK kinaza kiểu dại hoặc kiểu đột biến được biểu hiện lệch vị trí trong đó (James, C., *et al. Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., *et al. JBC* 280:41.893-41.899). Các kết quả đầu ra bao gồm tác dụng của các hợp chất đối với sự tồn tại tế bào, sự tăng sinh tế bào, và các protein JAK, STAT, Akt hoặc Erk được phosphoryl hóa.

Một số hợp chất trong tài liệu này có thể được đánh giá về hoạt tính của chúng ức chế sự tăng sinh của tế bào T. Thử nghiệm như vậy có thể được coi là thử nghiệm tăng sinh dẫn truyền bởi xytokin thứ hai (tức là, JAK) và cũng là thử nghiệm đơn giản về sự ức chế miễn dịch hoặc sự ức chế hoạt tính miễn dịch. Sau đây là tóm tắt ngắn gọn về cách thực hiện các thử nghiệm này. Các tế bào đơn nhân máu ngoại biên (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) được điều chế từ toàn bộ mẫu máu của người bằng cách sử dụng phương pháp tách Ficoll Hypaque và các tế bào T (phân đoạn 2000) có thể thu được từ PBMC bằng phương pháp rửa lắng. Các tế bào T ở người mới được phân lập này có thể được giữ trong môi trường nuôi cấy (RPMI 1640 có bổ sung huyết thanh bào thai bò 10%, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) với mật độ 2×10^6 tế bào/ml ở 37°C cho đến 2 ngày. Đối với phép phân tích tăng sinh tế bào được kích thích bởi IL-2, thì các tế bào T được xử lý trước hết với phytohemagglutinin (PHA) ở nồng độ cuối là 10 µg/mL trong thời gian 72 giờ. Sau khi rửa một lần bằng PBS, 6000 tế bào/giếng được đặt trong các đĩa kiểu 96 giếng và được xử lý bằng các hợp chất ở các nồng độ khác nhau trong môi trường nuôi cấy với sự có mặt của IL-2 của người 100 U/mL (của hãng ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Ở các đĩa này ở 37°C trong thời gian 72 giờ và đánh giá chỉ số tăng sinh bằng các thuốc thử huỳnh quang CellTiter-Glo theo quy trình được gợi ý từ nhà sản xuất (của hãng Promega; Madison, WI).

Ví dụ C: Hiệu quả chống khối u *in vivo*

Các hợp chất này có thể được đánh giá trong các mô hình ghép dị loài khối u ở người trong những con chuột nhất bị gây tổn thương miễn dịch. Ví dụ, một biến thể gây khối u thuộc dòng tế bào tương bào INA-6 có thể được sử dụng để cấy dưới da chuột nhất SCID (Burger, R., *et al. Hematol J.* 2:42-53, 2001). Sau đó, các con vật mang khối u có thể được phân ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị bằng thuốc hoặc chất dẫn thuốc và các liều lượng khác nhau của các hợp chất có thể được dùng theo các con đường thông thường bất kỳ bao gồm đường miệng, trong màng bụng (i.p.), hoặc truyền liên tục sử dụng bơm có thể cấy ghép. Sự tăng trưởng khối u theo thời gian sử dụng compa đo ngoài (caliper). Thêm nữa, các mẫu khối u có thể được thu gom tại bất kỳ thời điểm nào sau khi bắt đầu điều trị để phân tích như mô tả ở trên (Ví dụ B) nhằm đánh giá các tác động của hợp chất đối với hoạt tính của JAK và các con đường truyền tín hiệu xuôi dòng. Ngoài ra, độ chọn lọc của (các) hợp chất có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các mô hình khối u ghép dị loài mà được dẫn truyền bởi các kinaza khác đã biết (ví dụ: Bcr-Abl) như mô hình khối u K562.

Ví dụ D: Thử nghiệm đáp ứng quá mẫn muộn do tiếp xúc da ở chuột

Các hợp chất ở đây cũng có thể được thử nghiệm về hiệu quả của chúng (để ức chế các đích JAK) trong mô hình thử nghiệm quá mẫn muộn ở chuột được dẫn truyền bởi tế bào T. Đáp ứng quá mẫn tấp muộn (delayed-type hypersensitivity - DTH) do tiếp xúc da ở chuột được xem là mô hình có căn cứ về bệnh viêm da tiếp xúc lâm sàng, và các rối loạn miễn dịch về da do tế bào lympho T là trung gian gây ra, như bệnh vẩy nến (*Immunol Today*. Tháng 01/1998; 19(1):37-44). DTH ở chuột có chung nhiều điểm đặc trưng với bệnh vẩy nến, bao gồm cả sự thâm nhiễm miễn dịch, sự gia tăng đi kèm của các xytokin gây viêm, và sự tăng sinh quá mức tế bào sừng. Hơn nữa, nhiều loại tác nhân mà có hiệu quả trong việc điều trị bệnh vẩy nến trong xét nghiệm lâm sàng cũng là chất ức chế hiệu quả đáp ứng DTH ở chuột (*Agents Actions*. Tháng 01/1993; 38(1-2):116-21).

Vào ngày 0 và 1, chuột nhất Balb/c được gây nhạy cảm bằng cách bôi khu trú vào vùng bụng đã cạo lông của chúng bằng các kháng nguyên 2,4,dinitro-flobenzen (DNFB). Vào ngày 5, đo độ dày của tai bằng cách sử dụng trắc vi kế kỹ

thuật số. Ghi lại giá trị đo được và sử dụng làm mức cơ sở. Sau đó cả hai tai của những con vật này được thử nghiệm bôi khu trú DNFB với tổng thể tích là 20 μL (10 μL ở loa tai trong và 10 μL ở loa tai ngoài) với nồng độ 0,2%. Hai mươi bốn đến bảy mươi hai giờ sau khi bôi thuốc, đo lại độ dày của tai. Việc điều trị bằng các hợp chất thử nghiệm được áp dụng trong suốt các giai đoạn làm nhạy cảm và sử dụng thuốc này (ngày -1 đến ngày 7) hoặc trước khi và trong suốt giai đoạn dùng thuốc này (thường là buổi chiều của ngày thứ 4 đến ngày thứ 7). Việc điều trị bằng các hợp chất thử nghiệm (ở nồng độ khác nhau) được dùng theo cách toàn thân hoặc khu trú (bôi khu trú vào tai để điều trị). Những hiệu quả của các hợp chất thử nghiệm được cho thấy bởi sự giảm mức sưng tai so với tình trạng không được điều trị. Các hợp chất làm giảm 20% hoặc nhiều hơn được coi là hiệu quả. Trong một số thí nghiệm, những con chuột nhất được cho dùng thuốc nhưng không được làm nhạy cảm (đối chứng âm).

Tác dụng ức chế (ức chế sự hoạt hóa các con đường JAK-STAT) của các hợp chất thử nghiệm có thể được khẳng định bằng phép phân tích hóa mô miễn dịch. Sự hoạt hóa của (các) con đường JAK-STAT dẫn đến sự hình thành và sự chuyển vị của các yếu tố phiên mã chức năng. Hơn nữa, dòng các tế bào miễn dịch và sự tăng sinh tế bào sừng tăng lên cũng cần mang lại những thay đổi về profin biểu hiện độc nhất trong tai mà có thể được nghiên cứu và định lượng. Những phần tai được nhóm lại trong parafin và cố định bằng formalin (thu được sau giai đoạn dùng thuốc trong mô hình DTH) phải trải qua quá trình phân tích mô hóa học miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể tương tác đặc hiệu với STAT3 phosphoryl hóa (dòng 58E12, kỹ thuật tạo tín hiệu tế bào - Cell Signaling Technologies). Tai của chuột nhất được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm, chất dẫn, hoặc dexamethason (phương pháp điều trị hiệu quả trong lâm sàng cho bệnh vẩy nến), hoặc không được điều trị, trong mô hình DTH để so sánh. Các hợp chất thử nghiệm và dexamethason có thể tạo ra những thay đổi về phiên mã tương tự cả về chất và lượng, và cả các hợp chất thử nghiệm và dexamethason đều có thể làm giảm số lượng tế bào xâm nhập. Cả hai phương pháp điều trị theo cách dùng các hợp chất thử nghiệm ở dạng toàn thân và khu trú có thể gây ra tác dụng ức chế, tức là, làm giảm số lượng tế bào xâm nhập và ức chế những thay đổi về phiên mã.

Ví dụ E: Hoạt tính chống viêm *in vivo*

Các hợp chất trong tài liệu này có thể được đánh giá trong các mô hình động vật gặm nhấm hoặc động vật không phải loài gặm nhấm được thiết kế để sao chép một đáp ứng viêm duy nhất hay phức tạp. Ví dụ, các mô hình bệnh viêm khớp ở động vật gặm nhấm có thể được sử dụng để đánh giá tiềm năng điều trị của các hợp chất ở liều điều trị dự phòng hoặc điều trị bệnh. Những mô hình này bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh viêm khớp ở chuột nhắt hoặc chuột cống do collagen gây ra, bệnh viêm khớp ở chuột nhắt do tá được gây ra, và bệnh viêm khớp do kháng thể collagen gây ra. Bệnh tự miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh đa xơ cứng, bệnh tiểu đường type I, viêm màng giữa và đáy mắt, viêm tuyến giáp, chứng nhược cơ năng, bệnh thận globulin miễn dịch, viêm cơ tim, nhạy cảm đường hô hấp (hen suyễn), bệnh luput, hoặc viêm đại tràng cũng có thể được sử dụng để đánh giá tiềm năng điều trị bệnh của các hợp chất này. Những mô hình này cũng được thiết lập trong cộng đồng nghiên cứu và quen thuộc với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này (Current Protocols in Immunology, Tập 3, Coligan, J.E. *et al*, Wiley Press.; *Methods in Molecular Biology*: Tập 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. and Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

Ví dụ F: Các mô hình động vật để điều trị bệnh mắt khô, viêm màng bồ đào, và viêm kết mạc

Các hợp chất có thể được đánh giá trong một hoặc nhiều mô hình tiền lâm sàng về bệnh khô mắt đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết đến bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mô hình tuyến lệ concanavalin A (ConA) ở thỏ, mô hình scopolamin ở chuột nhắt (dùng dưới da hoặc qua da), mô hình tuyến lệ ở chuột nhắt Botulinum, hoặc mô hình bất kỳ trong một số mô hình tự miễn dịch ở loài gặm nhấm tự phát dẫn đến rối loạn chức năng tuyến ở mắt (ví dụ như NOD-SCID, MRL/lpr, hoặc NZB/NZW) (Barabino *et al.*, Experimental Eye Research 2004, 79, 613-621 và Schrader *et al.*, Developmental Ophthalmology, Karger 2008, 41, 298-312, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Các phân tích cuối trong các mô hình này có thể bao gồm mô bệnh học của các tuyến ở mắt và của mắt (giác mạc, v.v) và có thể là thử nghiệm Schirmer cổ điển hoặc các phiên bản sửa đổi của thử nghiệm (Barabino *et al.*) đo mức nước mắt tạo thành. Hoạt tính có thể được đánh giá bằng cách cấp liều dùng

theo nhiều đường cấp (ví dụ như toàn thân hoặc khu trú) mà có thể bắt đầu trước hoặc sau khi xuất hiện bệnh.

Các hợp chất có thể được đánh giá trong một hoặc nhiều mô hình tiền lâm sàng về bệnh viêm màng bồ đào đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết đến. Các mô hình này bao gồm, nhưng không giới hạn ở các mô hình về viêm màng bồ đào tự miễn thực nghiệm (experimental autoimmune uveitis - EAU) và viêm màng bồ đào do nội độc tố gây ra (endotoxin induced uveitis - EIU). Các thực nghiệm EAU có thể được thực hiện ở thỏ, chuột cống, hoặc chuột nhắt và có thể liên quan đến khả năng tạo miễn dịch thụ động hoặc chủ động. Ví dụ, bất kỳ kháng nguyên nào trong số các kháng nguyên võng mạc có thể được sử dụng để làm nhạy cảm các con vật với kháng nguyên liên quan sau đó các con vật có thể được cấp theo đường mắt với kháng nguyên tương tự. Các mô hình EIU thì nhạy hơn và liên quan đến phương thức cấp lipopolysaccharit khu trú hoặc toàn thân với các liều lượng không gây chết. Quy trình cuối cho cả hai mô hình EIU và EAU có thể bao gồm bước soi đáy mắt, mô bệnh học trong số những bước quy trình khác. Những mô hình này được xem xét bởi Smith et al. (Immunology and Cell Biology 1998, 76, 497-512, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Hoạt tính được đánh giá bằng cách dùng liều theo nhiều đường cấp (ví dụ như toàn thân hoặc khu trú) mà có thể bắt đầu trước hoặc sau khi xuất hiện bệnh. Một số mô hình được liệt kê ở trên cũng có thể tiến triển bệnh viêm củng mạc/viêm thượng củng mạc, viêm màng mạch, viêm thể mi, hoặc viêm móng mắt và do đó hữu ích trong việc nghiên cứu hoạt tính tiềm năng của các hợp chất dùng để điều trị các bệnh này.

Các hợp chất cũng có thể được đánh giá trong một hoặc nhiều mô hình tiền lâm sàng về bệnh viêm kết mạc đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết đến. Các mô hình này bao gồm, nhưng không giới hạn ở các mô hình động vật gặm nhấm sử dụng chuột lang, chuột cống, hoặc chuột nhắt. Các mô hình chuột lang bao gồm những mô hình sử dụng phương pháp miễn dịch chủ động hoặc thụ động và/hoặc các quy trình thách thức miễn dịch với các kháng nguyên như ovalbumin hoặc giống cúc vàng dại (xem trong tài liệu của Groneberg, D.A., et al., Allergy 2003, 58, 1101-1113, mà được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Các mô hình chuột cống và chuột nhắt là tương tự như trong thiết kế chung cho các mô hình chuột lang (cũng xem tài liệu của Groneberg). Hoạt tính có thể được đánh

giá bằng cách cho dùng liều theo nhiều đường cấp (ví dụ như toàn thân hoặc khu trú) mà có thể bắt đầu trước hoặc sau khi xuất hiện bệnh. Các phân tích cuối cho các nghiên cứu này có thể bao gồm ví dụ, mô học, miễn dịch học, sinh hóa, hoặc phân tích phân tử các mô ở mắt như kết mạc.

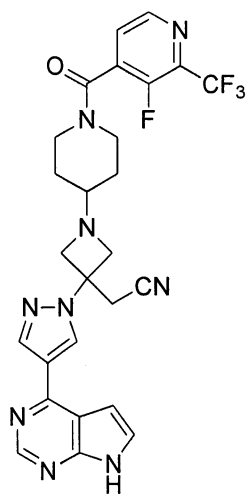
Ví dụ G: Bảo vệ xương *in vivo*

Các hợp chất có thể được đánh giá trong các mô hình tiền lâm sàng khác nhau về chứng thiếu xương, loãng xương, hoặc tiêu xương đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết đến. Ví dụ, các loài gặm nhấm đã cắt buồng trứng có thể được sử dụng để đánh giá khả năng của các hợp chất tác động đến các triệu chứng và dấu hiệu về tái tạo mô xương và/hoặc mật độ xương (W.S.S. Jee và W. Yao, *J Musculoskel. Nueron. Interact.*, 2001, 1(3), 193-207, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Theo cách khác, mật độ và cấu trúc xương có thể được đánh giá ở những loài động vật gặm nhấm được điều trị bằng hợp chất hoặc chất đối chứng trong các mô hình điều trị chứng thiếu xương (ví dụ, do glucocorticoid) gây ra (Yao, et al. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; và *id.* 58(11), 1674-1686, cả hai tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Ngoài ra, những tác động của các hợp chất đối với chứng tiêu xương và mật độ xương có thể đánh giá được trong các mô hình bệnh viêm khớp ở động vật gặm nhấm như được thảo luận ở trên (Ví dụ E). Các phân tích cuối cho tất cả các mô hình này có thể khác nhau nhưng thường bao gồm các phép đánh giá mô học và phóng xạ cũng như mô học miễn dịch và các dấu hiệu sinh hóa thích hợp của quá trình tái tạo xương.

Một số phương án của sáng chế đã được mô tả. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không tách khỏi ý tưởng và phạm vi của sáng chế. Theo đó, các phương án khác cũng nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

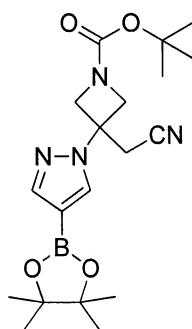
1. Quy trình điều chế hợp chất có công thức I:



I

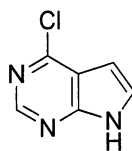
hoặc muối của nó, bao gồm bước:

cho hợp chất có công thức IIIa:



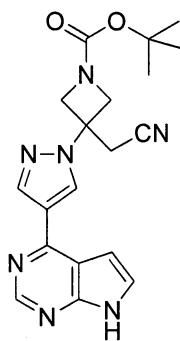
IIIa

phản ứng với hợp chất có công thức IVa:



IVa

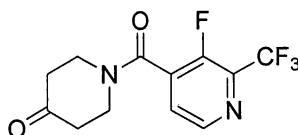
trong các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki để tạo thành hợp chất có công thức IIa:



IIa;

khử bảo vệ hợp chất có công thức IIa bằng cách cho hợp chất này phản ứng với axit clohydric để tạo thành muối 2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua; và

cho muối 2-(3-(4-(7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua phản ứng với hợp chất có công thức VI:



VI

với sự có mặt của chất khử để tạo thành hợp chất có công thức I, hoặc muối của nó.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó các điều kiện phản ứng ghép cặp Suzuki bao gồm gia nhiệt hỗn hợp phản ứng chứa hợp chất có công thức IIIa, hợp chất có công thức IVa, chất xúc tác ghép cặp Suzuki, bazơ và thành phần dung môi.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó chất xúc tác ghép cặp Suzuki là:

(a) $\text{Pd(dppf)}_2\text{Cl}_2$, [1,1'-bis(dixyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi (II), tetrakis(triphenylphosphine)paladi(0), hoặc tetrakis(tri(o-tolyl)phosphin)paladi(0); hoặc

(b) [1,1'-bis(dixyclohexylphosphino)feroxen]diclopaladi (II).

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó bazơ là:

(a) natri cacbonat, kali cacbonat, hoặc xezi florua; hoặc

(b) xezi florua.

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó bazơ là xezì florua và có mặt với lượng là 3 đương lượng hoặc nhiều hơn dựa trên hợp chất có công thức IVa.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó thành phần dung môi bao gồm *tert*-butanol và nước.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó các hợp chất có công thức IIIa và IVa có mặt với tỷ lệ mol là khoảng 1:1.
8. Quy trình theo điểm 1, trong đó axit clohydric có mặt với lượng từ 5 đến 8 đương lượng dựa trên hợp chất có công thức IIa.
9. Quy trình theo điểm từ 1 đến 8, trong đó phản ứng của muối 2-(3-(4-(7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua với hợp chất có công thức VI được thực hiện với sự có mặt của ít nhất hai đương lượng bazơ thứ hai.
10. Quy trình theo điểm 9, trong đó bazơ thứ hai là:
 - (a) amin bậc ba; hoặc
 - (b) trietylamin.
11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chất khử là:
 - (a) natri xyanoborohydrua hoặc natri triaxetoxiborohydrua; hoặc
 - (b) natri triaxetoxiborohydrua.
12. Quy trình theo điểm 11, trong đó chất khử là natri triaxetoxiborohydrua và nhiều hơn 1 đương lượng natri triaxetoxiborohydrua được sử dụng dựa trên muối 2-(3-(4-(7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua.
13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó nhiều hơn 1 đương lượng hợp chất có công thức VI được sử dụng dựa trên muối 2-(3-(4-(7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril dihydroclorua.
14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó phản ứng của muối 2-(3-(4-(7H-pyrol[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-

yl)axetonitril dihydroclorua với hợp chất có công thức VI được thực hiện trong dung môi diclometan.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó quy trình này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức I phản ứng với axit adipic để tạo thành muối adipat của hợp chất có công thức I.