



(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)



1-0023934

(51)⁷ C07D 487/04; C07D 491/10

(13) B

(21) 1-2014-00977

(22) 06/09/2012

(86) PCT/US2012/053921 06/09/2012

(87) WO2013/036611 14/03/2013

(30) 61/531,896 07/09/2011 US

(45) 25/06/2020 387

(43) 26/05/2014 314A

(73) INCYTE HOLDINGS CORPORATION (US)

1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, DE 19803, United States of America

(72) ZHOU, Jiacheng (US); LIU, Pingli (CN); CAO, Ganfeng (CN); WU, Yongzhong (CN)

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

(54) QUY TRÌNH VÀ HỢP CHẤT TRUNG GIAN ĐỂ ĐIỀU CHẾ CHẤT ỨC CHẾ
JANUS KINAZA (JAK)

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình và hợp chất trung gian dùng để điều chế hợp chất {1-{1-[3-flo-2-(triflorometyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril, hữu ích trong việc điều trị các bệnh liên quan đến hoạt tính của các loại Janus kinaza(JAK) bao gồm các rối loạn viêm, rối loạn tự miễn, bệnh ung thư, và các bệnh khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình và hợp 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, hữu ích trong việc điều trị các bệnh liên quan đến hoạt tính của các enzym Janus kinaza (JAK) bao gồm các rối loạn viêm, các rối loạn tự miễn, bệnh ung thư, và các bệnh khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các protein kinaza (các PK) điều hòa nhiều quá trình sinh học khác nhau bao gồm quá trình phát triển, tồn tại, biệt hóa tế bào, tạo cơ quan, tạo hình thái, tạo mạch mới, phục hồi mô và tái tạo mô, trong số nhiều quá trình liên quan khác. Các protein kinaza cũng đóng vai trò chuyên biệt trong nhiều bệnh ở người bao gồm cả bệnh ung thư. Các xytokin là các polypeptit hoặc glycoprotein có khối lượng phân tử thấp, có chức năng điều hòa nhiều con đường liên quan đến đáp ứng viêm của vật chủ đối với việc nhiễm khuẩn. Các xytokin ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa, tăng sinh và hoạt hóa tế bào, và có thể điều hòa cả những đáp ứng tiền viêm và kháng viêm, cho phép vật chủ phản ứng thích hợp với các mầm bệnh.

Quá trình dẫn truyền tín hiệu của rất nhiều loại xytokin liên quan đến họ Janus kinaza (JAK) của các protein tyrosin kinaza và các chất dẫn truyền tín hiệu và các chất hoạt hóa quá trình phiên mã (Signal Transducers and Activator of Transcription - STAT). Có bốn loại JAK đã biết ở động vật có vú: 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 đáp ứng viêm và miễn dịch được kích thích bởi xytokin góp phần vào quá trình phát sinh các bệnh: các bệnh lý như suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng (Severe combined immunodeficiency - SCID) phát sinh do sự ức chế hệ miễn dịch, trong khi đó đáp ứng miễn dịch/viêm quá mức hoặc không phù hợp góp phần làm phát sinh các bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh hen suyễn, lupus ban đỏ hệ thống, viêm tuyến giáp, viêm cơ tim),

và các chứng bệnh như bệnh xơ cứng bì và bệnh viêm khớp xương (Ortmann, R. A., T. Cheng, *et al.* (2000) *Arthritis Res* 2(1): 16-32).

Việc thiếu biểu hiện các JAK đi kèm theo nhiều tình trạng bệnh. Ví dụ, chuột Jak1^{-/-} bị còi khi sinh, không bú được, và chết non (Rodig, S. J., M. A. Meraz, *et al.* (1998) *Cell* 93(3): 373-83). Phôi chuột Jak2^{-/-} bị thiếu máu và chết trong khoảng 12,5 ngày sau khi thụ thai do không có quá trình tạo hồng cầu hoàn chỉnh.

Con đường JAK/STAT, và đặc biệt là cả bốn loại JAK, được cho có vai trò trong bệnh lý về phản ứng hen suyễn, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, viêm phế quản, và các bệnh viêm đường hô hấp dưới có liên quan khác. Nhiều xytokin phát tín hiệu qua các JAK có liên quan đến các bệnh/tình trạng viêm của đường hô hấp trên, như các bệnh ảnh hưởng tới mũi và xoang (*ví dụ*, viêm mũi và viêm xoang) cho dù có các phản ứng dị ứng thông thường hay không. Quá trình JAK/STAT cũng có liên quan đến các bệnh/các tình trạng viêm của mắt và những đáp ứng dị ứng mạn tính.

Việc hoạt hóa JAK/STAT trong các bệnh ung thư có thể xảy ra do sự kích thích xytokin (*ví dụ* IL-6 hoặc GM-CSF) hoặc do hiện tượng giảm lượng chất nội sinh ức chế quá trình truyền tín hiệu JAK như chất ức chế quá trình truyền tín hiệu xytokin (suppressor of cytokine signaling - SOCS) hoặc chất ức chế protein của STAT đã hoạt hóa (PIAS – protein inhibitor of activated STAT) (Boudny, V., and Kovarik, J., *Neoplasia*. 49:349-355, 2002). Việc hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu STAT, cũng như các quá trình khác sau đó của JAK (*ví dụ*, Akt), có tương quan với tiên lượng xấu trong nhiều loại bệnh ung thư (Bowman, T., *et al. Oncogene* 19:2474-2488, 2000). Mức xytokin tuần hoàn tăng cao mà truyền tín hiệu thông qua JAK/STAT đóng vai trò là nguyên nhân gây ra chứng suy mòn và/hoặc mệt mỏi mạn tính. Như vậy, việc ức chế JAK có thể đem lại lợi ích nhất định cho các bệnh nhân ung thư vì nhiều lý do, ngoài lý do tạo ra hoạt tính kháng ung thư tiềm ẩn.

Kinaza tyrosin JAK2 có thể đem lại lợi ích cho các bệnh nhân mắc các rối loạn tăng sinh tế bào tủy xương, ví dụ, chứng đa hồng cầu nguyên phát (polycythemia vera - PV), tăng tiểu cầu nguyên phát (essential thrombocythemia - ET), dị sản tủy xương kết hợp xơ tủy nguyên phát (myeloid metaplasia with myelofibrosis - MMM) (Levin, *et al., Cancer Cell*, vol. 7, 2005: 387-397). Việc ức chế kinaza JAK2V617F làm giảm sự tăng

sinh các tế bào tạo huyết, điều này gợi ý rằng JAK2 là một đích tiềm năng để ức chế về mặt dược lý ở các bệnh nhân mắc PV, ET, và MMM.

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

JAK1 đóng vai trò trung tâm trong một số quá trình truyền tín hiệu của yếu tố tăng trưởng và xytokin mà, khi bị rối loạn điều hòa, có thể dẫn tới hoặc góp phần gây ra các tình trạng bệnh. Ví dụ, mức IL-6 tăng cao ở bệnh viêm khớp dạng thấp, một bệnh mà trong đó mức IL-6 tăng cao được cho có tác động có hại (Fonesca, J.E. et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). Do các tín hiệu IL-6, ít nhất là một phần, thông qua JAK1, đối kháng IL-6 trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua việc ức chế JAK1 được mong đợi là đem lại các lợi ích lâm sàng (Guschin, D., N., et al *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, J. S., et al. *Lancet* 371:987, 2008). Ngoài ra, trong một vài bệnh ung thư, JAK1 bị đột biến, dẫn đến sự tồn tại và phát triển không mong muốn của các tế bào cấu thành nên khối u (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci U S A.*106:9414-8, 2009; Flex E., et al. *J Exp Med.* 205:751-8, 2008). Trong các bệnh tự miễn và các bệnh ung thư khác, mức xytokin gây viêm tăng cao toàn thân gây hoạt hóa JAK1 cũng có thể góp phần gây bệnh và/hoặc các triệu chứng liên quan. Vì thế, các bệnh nhân mắc những bệnh này có thể có lợi khi ức chế JAK1. Các chất ức chế chọn lọc JAK1 có thể là hiệu quả đồng thời tránh được những tác động không mong muốn và không cần thiết có thể xảy ra do việc ức chế các JAK kinaza khác.

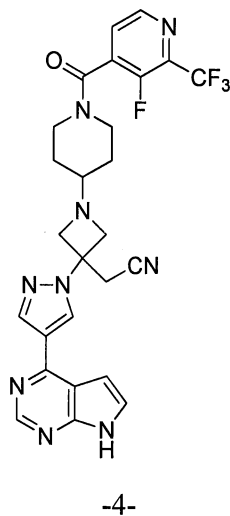
Các chất ức chế chọn lọc đối với JAK1, so với các JAK kinaza khác, có thể đem lại nhiều lợi ích điều trị hơn so với các chất ức chế có tính chọn lọc thấp hơn. Liên quan đến tính chọn lọc kháng JAK2, một số xytokin và yếu tố tăng trưởng quan trọng phát tín hiệu thông qua JAK2 bao gồm, ví dụ, erythropoietin (Epo) và thrombopoietin (Tpo) (Parganas E, et al. *Cell.* 93:385-95, 1998). Epo là một yếu tố tăng trưởng chủ chốt cho quá trình sản sinh tế bào hồng cầu; vì thế khi quá trình truyền tín hiệu phụ thuộc Epo xảy ra với mức thấp có thể dẫn tới làm giảm số lượng các tế bào hồng cầu và gây bệnh thiếu máu (Kaushansky K, *NEJM* 354:2034-45, 2006). Tpo, một ví dụ khác về yếu tố

tăng trưởng phụ thuộc JAK2, đóng vai trò trung tâm trong việc kiểm soát quá trình tăng sinh và trưởng thành của các tế bào nhân khổng lồ – các tế bào sinh ra các tiểu cầu (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Như vậy, quá trình truyền tín hiệu Tpo giảm sẽ có thể làm giảm số lượng tế bào nhân khổng lồ (chứng giảm tế bào nhân khổng lồ) và làm giảm số tiểu cầu tuần hoàn (chứng giảm tiểu cầu). Điều này có thể dẫn tới hiện tượng chảy máu không mong muốn và/hoặc không kiểm soát được. Khả năng ức chế giảm đối với các JAK khác, như JAK3 và Tyk2, có thể cũng được mong đợi vì người thiếu dạng chức năng của các kinaza này đã được chỉ là mắc nhiều bệnh như suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng hoặc hội chứng tăng quá mức 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 có ưu điểm đáng kể so với chất ức chế chọn lọc kém hơn nhờ các tác dụng phụ giảm bao gồm tác dụng ức chế miễn dịch, bệnh thiếu máu và sự giảm lượng tiểu cầu.

Do tính hữu ích của các chất ức chế JAK, nên có nhu cầu phát triển các quy trình mới để điều chế các chất ức chế JAK này. Sáng chế này đáp ứng nhu cầu này và những nhu cầu khác.

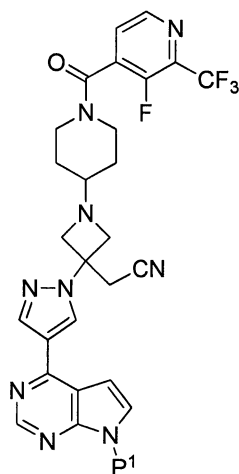
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chất ức chế JAK được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số 13/043,986, nộp ngày 9 tháng 3 năm 2011, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, bao gồm {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril, được mô tả dưới đây có công thức I.



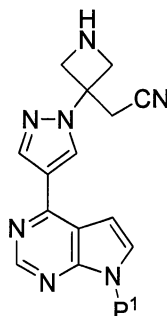
I

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



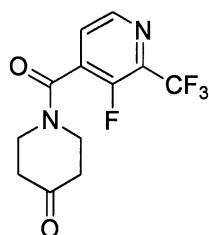
II

hoặc muối của nó, bao gồm bước cho hợp chất có công thức III:



III

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

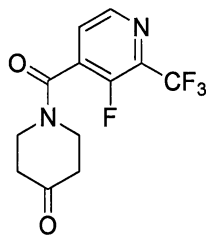


IV

hoặc muối của nó, khi có mặt của chất khử để tạo thành hợp chất có công thức II hoặc muối của hợp chất này, với điều kiện chất khử nêu trên không phải là natri xyanoborodoterit hydrua; trong đó P¹ là nhóm bảo vệ.

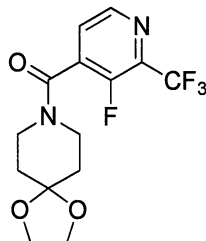
23934

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức IV:



IV

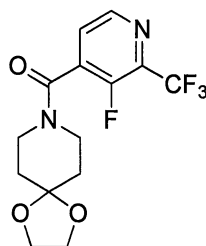
hoặc muối của nó, bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức V:



V

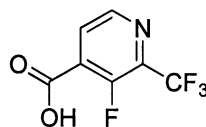
hoặc muối của nó, để tạo thành hợp chất có công thức IV, hoặc muối của hợp chất này.

Sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức V:



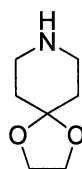
V

hoặc muối của nó, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VI:



VI

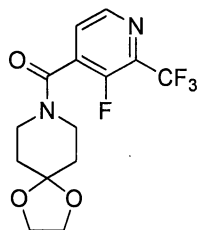
hoặc muối của nó, phản ứng với hợp chất có công thức VII:



VII

với sự có mặt của chất kết hợp để tạo thành hợp chất có công thức V, hoặc muối của hợp chất này.

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

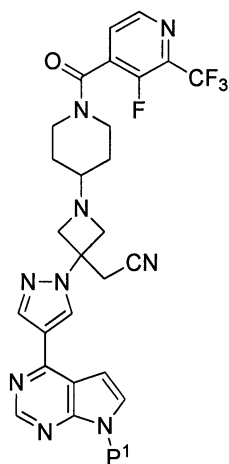


V

hoặc muối của nó.

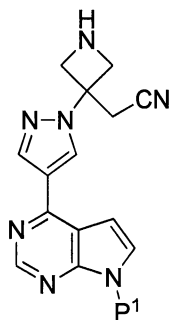
Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế hợp chất có công thức II:



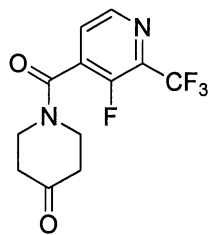
II

hoặc muối của nó, bao gồm bước cho hợp chất có công thức III:



III

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



IV

hoặc muối của nó, có mặt chất khử để tạo thành hợp chất có công thức II, hoặc muối của hợp chất này, với điều kiện chất khử nêu trên không là natri xyanoborodoterit hydrua; trong đó P¹ là nhóm bảo vệ.

Theo một số phương án, các hợp chất có công thức III và IV tốt hơn nếu được sử dụng dưới dạng các bazơ tự do và hợp chất có công thức II tốt hơn nếu được điều chế dưới dạng bazơ tự do. Như được sử dụng ở đây, “bazơ tự do” có nghĩa là dạng không phải là muối của hợp chất.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất III và hợp chất IV được thực hiện khi có mặt amin bậc ba (ví dụ, trietylamin). Theo một số phương án, nhiệt độ của phản ứng $\leq 30^{\circ}\text{C}$. Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong dung môi thích hợp. Theo một số phương án, dung môi thích hợp này là diclorometan.

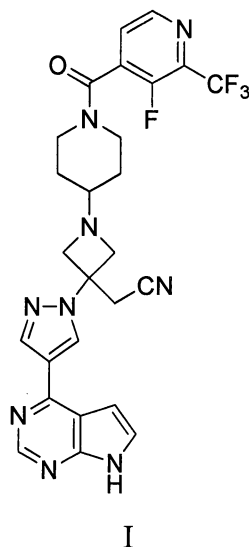
Các nhóm bảo vệ P¹ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm bảo vệ cho các amin được mô tả trong tài liệu của Wuts và Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, xuất bản lần thứ 4, John Wiley & Sons: New Jersey, các trang 696-887 (và, cụ thể là, các trang 872-887) (2007), toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, P¹ là benzyloxycarbonyl (Cbz), 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), 2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl (Teoc), 2-(4-trifluoromethylphenylsulfonyl)ethoxycarbonyl (Tsc), t-butoxycarbonyl (BOC), 1-adamantyloxycarbonyl (Adoc), 2-adamantylcarbonyl (2-Adoc), 2,4-dimethylpent-3-yloxycarbonyl (Doc), cyclohexyloxycarbonyl (Hoc), 1,1-dimethyl-2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (TcBOC), vinyl, 2-chloroethyl, 2-phenylsulfonyl, allyl, benzyl, 2-nitrobenzyl, 4-nitrobenzyl, diphenyl-4-pyridylmethyl, N',N'-dimethylhydrazinyl, metoxymethyl, t-butoxymethyl (Bum), benzyloxymethyl (BOM), 2-tetrahydropyranyl (THP), tri(C₁₋₄alkyl)silyl (ví dụ, tri(isopropyl)silyl), 1,1-

dietoxymetyl, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3(\text{SEM})$ hoặc N-pivaloyloxymetyl (POM). Theo một số phương án, P^1 là $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

Chất khử có thể là chất khử bất kỳ thích hợp để sử dụng trong quá trình amin hóa khử, bao gồm các chất khử borohydrua và boran khác nhau, như các chất khử nêu trong tài liệu của Ellen W. Baxter và Allen B. Reitz, *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents*, Organic Reactions, Chương 1, các trang 1-57 (Wiley, 2002), toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các nhóm không giới hạn của các chất khử thích hợp bao gồm borohydrua, xyanoborohydrua, tri(C_{1-4} axyl)oxyborohydrua (ví dụ, các dẫn xuất của triaxetoxyborohydrua), 9-borobixyclo[3,3,1]nonan hydrua, tri(C_{1-4} alkyl)borohydrua, và các dẫn xuất của disopinocampetylxyanoborohydrua, amino boran, phức chất boran-pyridin, và alkylaminboran. Các ví dụ không giới hạn về các chất khử thích hợp bao gồm natrixyanoborohydrua, natri triaxetoxyborohydrua, natrixyano-9-borobixyclo[3,3,1]nonan hydrua, tetrabutylamonixyanoborohydrua, xyanoborohydrua trên lớp nền rắn, tetrametylmoni triaxetoxyborohydrua, natri triaxetoxyborohydrua, lithi trietylborohydrua, lithi tri(sec-butyl)borohydrua, natri disopinocampetylxyanoborohydrua, catechol boran, boran tetrahydrofuran, natriborohydrua, kaliborohydrua, lithiborohydrua, paladin khi có mặt khí hydro, 5-ethyl-2-methylpyridinboran (PEMB), 2-picolineboran hoặc triaxetoxyborohydrua được mang bởi polyme. Theo một số phương án, bất kỳ chất nào trong số các chất nêu trên, và tốt hơn nếu là natrixyanoborohydrua, được sử dụng kết hợp với chất phụ gia titan (IV), chất dehydrat hóa, hoặc chất phụ gia kẽm halogenua. Theo một số phương án, chất khử này là tetra(C_{1-4} alkyl)amonixyanoborohydrua hoặc triaxetoxyborohydrua, xyanoborohydrua hoặc triaxetoxyborohydrua của kim loại kiềm, hoặc xyanoborohydrua hoặc triaxetoxyborohydrua của kiềm thổ. Theo một số phương án, chất khử này là xyanoborohydrua của kim loại kiềm. Theo một số phương án, chất khử được chọn từ natrixyanoborohydrua và natri triaxetoxyborohydrua. Theo một số phương án, chất khử này là natri triaxetoxyborohydrua. 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, titanetoxit, và các chất tương tự).

Theo một số phương án, quy trình nêu trên còn bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức II hoặc muối của hợp chất này, để tạo thành hợp chất có công thức I:



hoặc muối của nó.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức I ban đầu được tạo ra dưới dạng bazơ tự do từ dạng bazơ tự do của hợp chất có công thức II.

Theo một số phương án, quá trình khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức II phản ứng với chất khử bảo vệ thích hợp. Theo một số phương án, quá trình khử bảo vệ bao gồm bước xử lý bằng bo triflorua etherat, tiếp đó là bước xử lý bằng dung dịch amoni hydroxit. Theo một số phương án, quá trình khử bảo vệ được thực hiện trong dung môi thích hợp ở nhiệt độ $\leq 30^{\circ}\text{C}$, $\leq 20^{\circ}\text{C}$, $\leq 10^{\circ}\text{C}$, hoặc $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Theo một số phương án, dung môi thích hợp này là axetonitril.

Theo một số phương án, quá trình khử bảo vệ hợp chất có công thức II để tạo thành hợp chất có công thức I, còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức I phản ứng với axit adipic để tạo thành muối adipat.

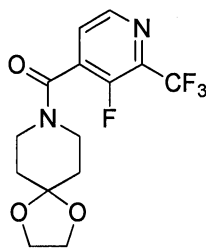
Theo một số phương án, quá trình này còn bao gồm:

- (a) đun hồi lưu hợp chất có công thức I trong methanol để tạo thành hỗn hợp;
- (b) sau bước (a), thêm metyl isobutyl keton vào hỗn hợp;
- (c) sau bước (b), loại bỏ một phần dung môi bằng cách chưng cất ở nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C để tạo thành hỗn hợp cô đặc;
- (d) sau bước (c), thêm metanol vào hỗn hợp cô đặc để tạo thành hỗn hợp pha loãng;
- (e) sau bước (d), đun hồi lưu hỗn hợp pha loãng để tạo thành hỗn hợp;

- (f) sau bước (e), thêm methyl isobutyl keton vào hỗn hợp;
- (g) sau bước (f), loại bỏ một phần dung môi bằng cách chưng cất ở nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C để tạo thành hỗn hợp cô đặc;
- (h) sau bước (g), thêm axit adipic và metanol vào hỗn hợp cô đặc;
- (i) sau bước (h), đun hồi lưu hỗn hợp; và
- (j) sau bước (i), loại bỏ một phần dung môi bằng cách chưng cất ở nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C để tạo thành hỗn hợp cô đặc;
- (k) sau bước (j), thêm heptan vào hỗn hợp; và
- (l) sau bước (k), khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng để tạo thành muối của axit adipic chứa hợp chất có công thức I.

Quá trình xử lý hợp chất có công thức II để loại bỏ nhóm P¹ có thể được thực hiện bằng những phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để loại bỏ các nhóm bảo vệ cụ thể cho các amin, như các nhóm được nêu trong tài liệu của Wuts và Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, xuất bản lần thứ tư, John Wiley & Sons: New Jersey, các trang 696-887 (và, cụ thể, các trang 872-887) (2007), toàn bộ nội dung của các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, theo một số phương án, nhóm P¹ được loại bỏ bằng cách xử lý bằng ion florua (ví dụ, xử lý bằng tetrabutylamoniflorua), axit clohydric, axitpyridin p-toluensulfonic (PPTS), hoặc axit Lewis (ví dụ, lithi tetrafloroborat). Theo một số phương án, quá trình xử lý bao gồm việc xử lý bằng lithi tetrafloroborat, tiếp đó là xử lý bằng amoni hydroxit (ví dụ, khi P¹ là 2-(trimethylsilyl)etoxymetyl). Theo một số phương án, quá trình xử lý bao gồm việc xử lý bằng bazơ (ví dụ, P¹ là N-pivaloyloxymetyl). Theo một số phương án, bazơ là hydroxit của kim loại kiềm. Theo một số phương án, bazơ là natri hydroxit. Theo một số phương án, quá trình xử lý bao gồm việc xử lý bằng natri hydroxit hoặc amoniac trong dung môi như metanol hoặc nước.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức IV, hoặc muối của nó, được điều chế theo quy trình bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức V:



hoặc muối của nó.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức V được sử dụng tốt hơn nếu dưới dạng bazơ tự do và hợp chất có công thức IV tốt hơn nếu được tạo ra dưới dạng bazơ tự do.

Theo một số phương án, quá trình khử bảo vệ này bao gồm bước cho phản ứng với dung dịch nước axit.

Theo một số phương án, axit là axit clohydric.

Theo một số phương án, lượng dư dung dịch nước axit so với hợp chất có công thức V sẽ được sử dụng. Theo một số phương án, dung dịch nước axit được sử dụng với lượng dư 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 đương lượng so với hợp chất có công thức V. Theo một số phương án, dung dịch nước axit được sử dụng với lượng dư 6, 7, 8, 9, hoặc 10 đương lượng hoặc nhiều hơn so với hợp chất có công thức V. Theo một số phương án, dung dịch nước axit được sử dụng với lượng dư 7, 8, 9, hoặc 10 đương lượng hoặc nhiều hơn so với hợp chất có công thức V. Theo một số phương án, dung dịch nước axit được sử dụng với lượng dư 8, 9, hoặc 10 đương lượng hoặc nhiều hơn so với hợp chất có công thức V. Theo một số phương án, dung dịch nước axit được sử dụng với lượng dư 9 hoặc 10 đương lượng hoặc nhiều hơn so với hợp chất có công thức V. Theo một số phương án, dung dịch nước axit được sử dụng với lượng dư 9 đương lượng hoặc nhiều hơn so với hợp chất có công thức V. Theo một số phương án, quá trình khử bảo vệ được thực hiện trong dung môi axetonitril ở nhiệt độ là $\leq 30^{\circ}\text{C}$, $\leq 20^{\circ}\text{C}$, $\leq 10^{\circ}\text{C}$, hoặc $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

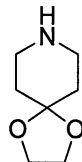
Các điều kiện khử bảo vệ thích hợp khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các điều kiện được nêu trong tài liệu của Wuts và Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, xuất bản lần thứ tư, John Wiley & Sons: New Jersey, các trang 696-887 (và, cụ thể là, các trang 872-887) (2007), toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức V được tạo thành bằng quy trình bao gồm bước cho hợp chất có công thức VI:



VI

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



VII

hoặc muối của nó, có mặt chất kết hợp.

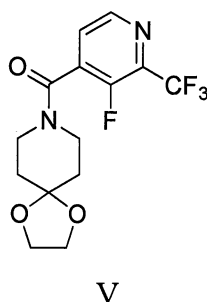
Các chất kết hợp thích hợp là chất bất kỳ trong số các chất kết hợp đã biết rõ, dùng để kết hợp amin với axit tạo thành amin. Các ví dụ không giới hạn bao gồm các carbodiimitt (ví dụ, N,N'-dicyclohexylcarbodiimitt (DCC), N,N'-diisopropylcarbodiimitt (DIC), 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl, hoặc dimethylaminopropyl)-N'-etylcarbodiimitt hydroclorua (EDC hydroclorua)) carbodiimitt (EDC), hoặc 1,1'-cacbonyldiimidazol(CDI)), chất phản ứng carbodiimitt khi có mặt 1-hydroxybenzotriazol (HOBt) hoặc hydrat của chúng, các chất kết hợp dựa trênphosphoni (ví dụ, benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphoni hexaflorophosphat (BOP), (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoni hexaflorophosphat (PyBOP), (7-azabenzotriazol-1-yloxy)-tris-pyrrolidinophosphoni hexaflorophosphat (PyAOP), bromotripyrrolidinophosphoni hexaflorophosphat (PyBrOP), bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic clorua (BOP-Cl)), các chất phản ứng dựa trên aminium (ví dụ, O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflorophosphat (HBTU), O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloroborat (TBTU), 3-(diethylphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DEPBT), O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflorophosphat (HATU), O-(6-clorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflorophosphat (HCTU), và O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloroborat (TATU)), các chất phản ứng trên cơ sở uroni(O-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloroborat (TNTU), và O-(N-suxinimidyl)-1,1,3,3-tetrametyluroni tetrafloroborat (TSTU), O-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloroborat

(TDBTU)), O-(1,2-dihydro-2-oxo-1-pyridyl-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloroborat (TPTU), hoặc O-[(etoxycacbonyl)xyano-metylenamino]-N,N,N',N'-tetrametyluroni tertafloroborat (TOTU)), các chất phản ứng khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 3-(dietylphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DEPBT), cacbonyldiimidazol (CDI), N,N,N',N'-tertametylcloroformamidium hexaflorophosphat (TCFH), hoặc dung dịch propylphosphonic anhydrua. Theo một số phương án, chất kết hợp là benzotriazol-1-yloxy-tris(dimetylamin)-phosphoni hexaflorophosphat (BOP).

Theo một số phương án, các hợp chất có các công thức V, VI, và VII, tốt hơn là ở dạng không phải là muối.

Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức VI và VII được thực hiện khi có mặt amin bậc ba (ví dụ, trietylamin). Theo một số phương án, phản ứng này được thực hiện trong dimetylformamit (DMF) ở nhiệt độ $\leq 30^{\circ}\text{C}$, $\leq 20^{\circ}\text{C}$, hoặc $\leq 15^{\circ}\text{C}$. Theo một số phương án, chất kết hợp có mặt với lượng $\geq 1,05$, $\geq 1,1$, hoặc $\geq 1,2$ đương lượng so với hợp chất có công thức VI.

Sáng chế cũng mô tả hợp chất có công thức V:



hoặc muối của nó, là sản phẩm trung gian hữu ích trong quy trình được mô tả ở trên.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức V là bazơ tự do.

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

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cho phản ứng” được sử dụng với nghĩa như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường dùng để chỉ việc kết hợp các chất phản ứng hóa học với nhau theo cách cho phép sự tương tác giữa chúng ở cấp độ phân tử để tạo ra sự biến đổi hóa học hoặc vật lý. Theo một số phương án, việc cho phản ứng bao 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 cho phản ứng của quy trình được mô tả ở đây có thể được tiến hành trong khoảng thời gian và trong các điều kiện thích hợp cho việc điều chế các sản phẩm xác định.

Quy trình điều chế các hợp chất có thể bao gồm phản ứng bảo vệ và khử bảo vệ nhiều nhóm hóa học khác nhau. Sự cần thiết của phản ứng bảo vệ và khử bảo vệ, và việc chọn các nhóm bảo vệ thích hợp có thể được xác định dễ dàng bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tính chất hóa học của các nhóm bảo vệ có thể được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu của Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, xuất bản lần thứ tư, Wiley & Sons, 2007, toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Việc điều chỉnh các nhóm bảo vệ và phương pháp tạo ra và phân cắt được mô tả ở đây có thể được điều chỉnh khi cần theo các nhóm thế khác nhau.

Có thể thực hiện các phản ứng của quy trình được mô tả ở đây trong các dung môi thích hợp mà có thể dễ dàng được chọn bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ. Các dung môi thích hợp có thể gần như không phản ứng với nguyên liệu khởi đầu (các chất phản ứng), hợp chất trung gian, hoặc các sản phẩm ở nhiệt độ mà tại đó các phản ứng được thực hiện, ví dụ, nhiệt độ có thể thay đổi từ nhiệt độ đóng băng của dung môi đến nhiệt độ sôi của dung môi. Phản ứng đã cho có thể được thực hiện trong một dung môi hoặc hỗn hợp của nhiều hơn một dung môi. Tùy thuộc vào bước phản ứng cụ thể, các dung môi thích hợp cho bước phản ứng cụ thể có thể được chọn. Theo một số phương án, các phản ứng có thể được thực hiện khi không có dung môi, như khi ít nhất một chất phản ứng là chất lỏng hoặc khí.

Các dung môi thích hợp có thể bao gồm các dung môi halogen hóa như cacbon tetraclohua, bromodiclorometan, dibromoclorometan, bromoform, cloroform, bromoclorometan, dibromometan, butyl clorua, diclorometan, tetracloreoetylen, tricloreoetylen, 1,1,1-tricloreoetan, 1,1,2-tricloreoetan, 1,1-dicloroetan, 2-cloropropan,

α,α,α -triflorotoluen, 1,2-dicloroetan, 1,2-dibromoetan, hexaflorobenzen, 1,2,4-triclorobenzen, 1,2-diclorobenzen, clorobenzen, florobenzen, các hỗn hợp của chúng và các dung môi tương tự.

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

Các dung môi phân cực có proton thích hợp có thể bao gồm, bằng cách lấy ví dụ và không giới hạn, nước, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-floroetanol, 2,2,2-trifloroetanol, etylen glycol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxyetanol, 1-butanol, 2-butanol, rượu i-butylic, rượu t-butylic, 2-etoxyetanol, dietylen glycol, 1-, 2-, hoặc 3-pentanol, rượu neo-pentylic, rượu t-pentylic, dietylen glycol monometyl ete, dietylen glycol monoetylete, xyclohexanol, rượu benzylic, phenol, hoặc glyxerol.

Các dung môi phân cực không proton thích hợp có thể bao gồm, bằng cách lấy ví dụ và không giới hạn, 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-metylpyrrolidinon (NMP), formamit, N-metylaxetamit, N-metylformamit, axetonitril, dimetyl sulfoxit, propionitril, etylfomat, metylaxetat, hexacloroaxeton, axeton, etylmetylketon, etylaxetat, 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 quá trình được mô tả ở đây có thể được thực hiện ở nhiệt độ thích hợp mà có thể dễ dàng xác định bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhiệt độ phản ứng sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, các điểm nóng chảy và các điểm sôi của các chất phản ứng và dung môi, nếu có; nhiệt động lực học của phản ứng (ví dụ, các phản ứng tỏa nhiệt mạnh có thể cần được thực hiện ở nhiệt độ giảm); và động học của phản ứng (ví dụ, hàng rào năng lượng hoạt hóa cao có thể cần nhiệt độ tăng). “Nhiệt độ tăng” dùng để chỉ nhiệt độ cao hơn nhiệt độ phòng (khoảng 22°C).

Các phản ứng của quy trình được mô tả ở đây có thể được thực hiện trong không khí hoặc trong khí quyển trơ. Thông thường, các phản ứng có chứa các chất phản ứng hoặc các sản phẩm mà gần như phản ứng với không khí có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp nhạy không khí mà đã được người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ.

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

Ví dụ về các axit 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 trifloroaxetic, axit propiolic, axit butyric, axit 2-butyric, axit vinyl axetic, axit pentanoic, axit hexanoic, axit heptanoic, axit octanoic, axit nonanoic và axit decanoic.

Ví dụ về các bazơ bao gồm lithi hydroxit, natri hydroxit, kali hydroxit, lithiacbonat, natricarbonat, và kalicarbonat. Một số ví dụ về bazơ mạnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hydroxit, các alkoxit, các amit kim loại, các hydrua kim loại, các dialkylamit kim loại và các arylamin, 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 natriamit, kaliarit và lithiamit; các hydrua kim loại bao gồm natrihydrua, kalihydrua và lithihydrua; và các dialkylamit kim loại bao gồm các muối natri và kali của các amit được thế metyl, etyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, t-butyl, trimetylsilyl và xyclohexyl.

Các hợp chất trung gian và các sản phẩm có thể cũng bao gồm các muối của các hợp chất được bộc lộ ở đây. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “muối” dùng để chỉ muối được tạo thành bằng cách bổ sung axit hoặc bazơ chấp nhận được vào hợp chất được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, các muối này là muối được dụng. Như được sử dụng ở đây, cụm từ “được dụng” dùng để chỉ chất được phép sử dụng trong các ứng dụng được phẩm theo quan điểm về khả năng gây độc và không tương tác bất lợi với các hoạt chất. Các muối được dụng, bao gồm các muối đơn và muối kép, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối thu được từ các axit vô cơ và hữu cơ như, nhưng

không chỉ giới hạn ở, axit axetic, lactic, xitric, xinnamic, tarttric, suxinic, fumaric, maleic, malonic, mandelic, malic, oxalic, propionic, hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, nitric, sulfuric, glycolic, pyruvic, metansulfonic, etansulfonic, toluensulfonic, salixylic, benzoic, và các axit chấp nhận được tương tự đã biết. Danh sách các muối thích hợp được tìm thấy trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences, xuất bản lần thứ 17, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, trang 1418 và Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Khi thực hiện việc điều chế các hợp chất theo quy trình được mô tả ở đây, các thao tác tách và tinh chế thông thường như cô đặc, lọc, chiết, chiết pha rắn, kết tinh lại, sắc ký, và các phương pháp tương tự có thể được sử dụng, để tách riêng các sản phẩm mong muốn.

Theo một số phương án, các hợp chất theo sáng chế, và muối của chúng, gần như được tách riêng. Thuật ngữ “gần như được tách” có nghĩa là hợp chất này được phân tách ít nhất một phần hoặc gần như toàn bộ ra khỏi môi trường mà trong đó nó được tạo thành hoặc được phát hiện. Phân tách một phần có thể bao gồm, ví dụ, chế phẩm được giàu hợp chất theo sáng chế. Phân tách gần như toàn bộ có thể bao gồm các chế phẩm có chứa ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 97%, hoặc ít nhất khoảng 99% theo khối lượng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của nó. Các phương pháp để tách các hợp chất và muối của chúng là các phương pháp thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cách sử dụng hợp chất

Hợp chất có công thức I, {1-{1-[3-flo-2-(triflorometyl)isonicotinoyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrololo[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 rất hữu ích trong việc 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, bệnh đào thải cơ quan ghép (ví dụ, bệnh đào thải mô ghép cùng loài và bệnh vật chủ chống lại mô ghép). Các ví dụ khác về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh tự miễn như đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp tuổi vị thành niên, viêm khớp vẩy nến, bệnh

đái tháo đường typ I, luput, bệnh vẩy nến, chứng viêm loét ruột, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, chứng nhược cơ, bệnh thận globulin miễn dịch, viêm cơ tim, các rối loạn tuyến giáp tự miễn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD), và các bệnh tương tự. Theo một số phương án, bệnh tự miễn này là rối loạn da có bọng nước tự miễn như bệnh pemphigus thông thường (pemphigus vulgaris, PV) hoặc bọng nước dạng pemphigus (bullous pemphigoid, BP).

Các ví dụ khác về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các tình trạng bệnh dị ứng như bệnh hen, dị ứng thực phẩm, viêm da dạng chàm, viêm da tiếp xúc, chứng viêm da cơ địa (eczema cơ địa), và viêm mũi. Các ví dụ khác về các bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh do virus như Virus Epstein Barr (EBV), virus viêm gan siêu vi B, viêm gan siêu vi C, HIV, HTLV 1, virus gây bệnh thủy đậu (Varicella-Zoster - VZV) và virus gây bệnh u nhú ở người (Human papilloma virus - HPV).

Các ví dụ khác về bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh liên quan đến sự luân chuyển sụn, ví dụ, viêm khớp do gút, viêm khớp do hoại tử hoặc nhiễm trùng, viêm khớp phản ứng, loạn dưỡng hệ thần kinh giao cảm phản xạ, đau loạn dưỡng, hội chứng Tietze, viêm khớp sườn, bệnh viêm xương khớp biến dạng địa phương (còn gọi là bệnh Kashin-Bek, xuất hiện do ăn phải thực phẩm được làm bằng lúa mì bị nhiễm các loại nấm *Fusarium sporotrichiella*), bệnh Mseleni, bệnh Handigodu, thoái hóa do đau cơ xơ hóa, lu-pút ban đỏ hệ thống, bệnh xơ cứng bì, hoặc bệnh viêm cột sống dính khớp.

Các ví dụ khác về bệnh liên quan đến JAK bao gồm các dị tật sụn bẩm sinh, bao gồm tiêu sụn di truyền, loạn sản sụn từng đám nhỏ, và loạn sản sụn giả (ví dụ, chứng tai nhỏ, không tai, và loạn sản sụn thuộc hành xương).

Các ví dụ khác về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm các rối loạn da như bệnh vẩy nến (ví dụ, bệnh vẩy nến thể thông thường), chứng viêm da cơ địa, phát ban, kích ứng da, mẫn cảm da (ví dụ, viêm da tiếp xúc hoặc viêm da tiếp xúc dị ứng). Ví dụ, một số chất nhất định kể cả một số dược chất khi được sử dụng khu trú có thể gây mẫn cảm da. Theo một số phương án, việc sử dụng đồng thời hoặc sử dụng lần lượt ít nhất một chất ức chế JAK theo sáng chế cùng với chất gây mẫn cảm da không mong muốn có thể có ích trong việc điều trị các chứng viêm da và da mẫn cảm không mong muốn. Theo một số phương án, rối loạn da này được điều trị bằng cách sử dụng khu trú ít nhất một chất ức chế JAK theo sáng chế.

Các ví dụ khác về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh đặc trưng bởi khối u rắn (*ví dụ*, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, các bệnh ung thư ở đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến giáp, u nguyên bào đệm, sacôm Kaposi (Kaposi's sarcoma), bệnh Castleman, sacôm cơ trơn ở tử cung, ung thư tế bào sắc tố đen v.v.), các bệnh ung thư máu (*ví dụ*, ung thư hệ bạch huyết, bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính (acute lymphoblastic leukemia - ALL), bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (acute myelogenous leukemia - AML) hoặc đa u tủy, và bệnh ung thư da như u lympho tế bào T ở da (cutaneous T-cell lymphoma - CTCL) và ung thư bạch huyết tế bào B ở da. Các ví dụ về CTCL bao gồm hội chứng Sezary và u sùi dạng nấm. Các ví dụ khác về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm chứng tăng huyết áp động mạch phổi.

Các ví dụ khác về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm các bệnh ung thư liên quan đến viêm. Theo một số phương án, bệnh ung thư này liên quan đến chứng viêm ruột. Theo một số phương án, chứng viêm ruột này là viêm loét đại tràng. Theo một số phương án, chứng viêm ruột này là bệnh Crohn. Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến viêm này là bệnh ung thư liên quan đến viêm đại tràng. Theo một số phương án, bệnh ung thư liên quan đến viêm này là bệnh ung thư đại tràng hoặc bệnh ung thư đại trực tràng. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư dạ dày, khối u dạng carcinoid ở đường tiêu hóa, u mô đệm đường tiêu hóa (gastrointestinal stromal tumor - GIST), caxinom tuyến, ung thư ruột non, hoặc ung thư trực tràng.

Các bệnh liên quan đến JAK còn có thể bao gồm các bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện của: các thể đột biến của JAK2 như các bệnh có ít nhất một đột biến trong vùng giả kinaza (*ví dụ*, JAK2V617F); các thể đột biến của JAK2 có ít nhất một đột biến bên ngoài vùng giả kinaza; các đột biến của JAK1; các đột biến của JAK3; các thể đột biến của thụ thể erythropoietin (EPOR); hoặc sự biểu hiện không điều hòa của CRLF2.

Các bệnh liên quan đến JAK còn có thể bao gồm các rối loạn tăng sinh tủy xương (myeloproliferative disorder - MPD) như chứng đa hồng cầu nguyên phát (polycythemia vera - PV), tăng tiểu cầu nguyên phát (essential thrombocythemia - ET), xơ hóa tủy xương với dị sản tủy (myeloid metaplasia with myelofibrosis - MMM), xơ hóa tủy

nguyên phát (primary myelofibrosis - PMF), bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (chronic myelomonocytic leukemia - CML), bệnh bạch cầu tủy đơn nhân mạn tính (chronic myelomonocytic leukemia - CMML), hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin (hypereosinophilic syndrome - HES), bệnh tế bào mast toàn thân (systemic mast cell disease - SMCD), và các bệnh tương tự. Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tủy xương là xơ hóa tủy (ví dụ, xơ hóa tủy nguyên phát (PMF) hoặc xơ hóa tủy xương sau đa hồng cầu nguyên phát/tăng tiểu cầu nguyên phát (Post-PV/Post-ET MF). Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tủy xương này là xơ hóa tủy xương sau tăng tiểu cầu nguyên phát (Post-ET MF). Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tủy xương này là xơ hóa tủy xương sau đa hồng cầu nguyên phát (Post-PV MF).

Các ví dụ khác về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến JAK bao gồm việc cải thiện các tác dụng phụ về da liễu của các dược phẩm khác bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế. Ví dụ, nhiều dược chất gây ra các phản ứng dị ứng không mong muốn mà có thể biểu hiện dưới dạng phát ban dạng mụn trứng cá hoặc chứng viêm da liên quan. Các dược chất ví dụ mà có các tác dụng phụ không mong muốn như vậy bao gồm các thuốc chống ung thư như gefitinib, cetuximab, erlotinib, và các chất tương tự. Các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng toàn thân hoặc khu trú (ví dụ, được khu trú ở gần vùng viêm da) kết hợp với (ví dụ, đồng thời hoặc lần lượt) dược chất có tác dụng phụ về da liễu không mong muốn. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng khu trú cùng với một hoặc nhiều hơn một dược phẩm khác, trong đó các dược phẩm khác này khi được bôi khu trú mà không có hợp chất theo sáng chế gây viêm da tiếp xúc, mẫn cảm dị ứng do tiếp xúc, hoặc rối loạn da tương tự. Do đó, các chế phẩm theo sáng chế bao gồm các chế phẩm khu trú có chứa hợp chất theo sáng chế và dược chất khác mà có thể gây viêm da, các rối loạn da, hoặc các tác dụng phụ liên quan.

Các bệnh khác liên quan đến JAK bao gồm chứng viêm và các bệnh viêm. Các bệnh viêm ví dụ bao gồm bệnh u hạt (sarcoidosis), các 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 tắc nghẽn phổi mạn tính, và các bệnh tương tự), viêm cơ như viêm cơ tim, và các bệnh viêm khác. Theo một số phương án, bệnh viêm mắt này là bệnh viêm mi mắt.

Các bệnh khác liên quan đến JAK bao gồm tổn thương tái đầy máu do thiếu máu cục bộ hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến hiện tượng viêm thiếu máu cục bộ như đột quỵ hoặc tim ngừng đập, tình trạng bệnh do nội độc tố (ví dụ, các biến chứng sau phẫu thuật bắc cầu hoặc các tình trạng có nội độc tố mạn tính góp phần vào bệnh suy tim mạn tính), chứng biếng ăn, chứng suy mòn, các bệnh mệt mỏi có nguyên nhân hoặc liên quan đến bệnh ung thư, sự phát triển hẹp van tim, viêm cứng bì, chứng xơ hóa, các tình trạng bệnh có liên quan đến tình trạng thiếu oxy huyết hoặc mô tế bào hình sao, ví dụ, bệnh vồng mạc do đái tháo đường, bệnh ung thư, hoặc thoái hóa thần kinh, và các bệnh viêm khác như hội chứng phản ứng viêm toàn thân (systemic inflammatory response syndrome - SIRS) và sốc nhiễm trùng.

Các bệnh khác liên quan đến JAK bao gồm bệnh gút và tăng kích thích tuyến tiền liệt do, ví dụ, phì đại tuyến tiền liệt lành tính hoặc tăng sản tuyến tiền liệt lành tính, cũng như các bệnh tiêu xương như chứng loãng xương hoặc viêm xương khớp, các bệnh tiêu xương liên quan đến: sự mất cân bằng nội tiết tố và/hoặc liệu pháp nội tiết tố, bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh sarcoid xương), hoặc bệnh ung thư (ví dụ bệnh u tủy).

Các bệnh khác liên quan đến JAK bao gồm rối loạn khô mắt. Như được sử dụng ở đây, “rối loạn khô mắt” được dự định bao gồm các tình trạng bệnh được tóm tắt trong một báo cáo chính thức gần đây của Hội thảo về chứng Khô Mắt (Dry Eye Workshop - DEWS), định nghĩa chứng khô mắt là “một căn bệnh về nước mắt và bề mặt mắt phụ thuộc nhiều yếu tố dẫn đến các triệu chứng khó chịu, rối loạn thị giác và màng nước mắt không ổn định có khả năng gây hại đến bề mặt mắt. Nó đi kèm với sự tăng nồng độ thẩm thấu của màng nước mắt và tình trạng viêm bề mặt mắt.” Lemp, “Định nghĩa và Phân loại bệnh khô mắt: Báo cáo của Phân ban Định nghĩa và Phân loại bệnh khô mắt tại Hội thảo Quốc tế về chứng Khô Mắt” (tiếng Anh là: “The Definition and Classification of Dry Eye Disease : Report of the Definition and Classification Subcommittee”), *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92 Tháng 4, 2007, toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, rối loạn khô mắt được chọn từ khô mắt do không sản sinh đủ nước mắt (aqueous tear-deficient dry eye - ADDE) hoặc rối loạn khô mắt do bay hơi, hoặc sự kết hợp thích hợp của chúng. Theo một số phương án, rối loạn khô mắt này là khô mắt trong hội chứng Sjogren (Sjogren syndrome dry eye -

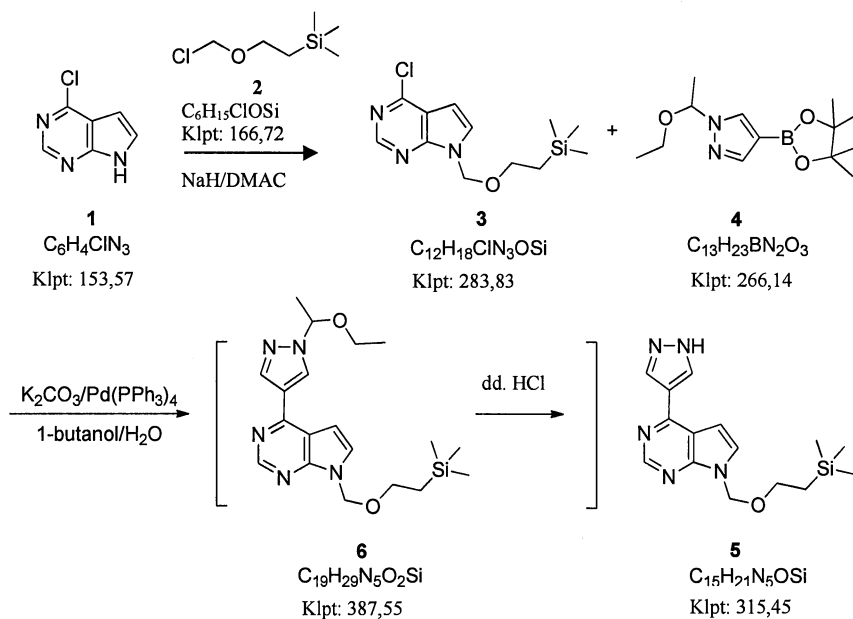
SSDE). Theo một số phương án, rối loạn khô mắt này không phải khô mắt trong hội chứng Sjogren (non-Sjogren syndrome dry eye - NSSDE).

Các bệnh khác liên quan đến JAK 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 mộng mắt. Các bệnh khác liên quan đến JAK bao gồm rối loạn chức năng hô hấp hoặc suy kiệt liên quan đến nhiễm virus, như virus cúm và SARS.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ cụ thể. Các ví dụ sau được đưa ra nhằm mục đích minh họa, và mà không dự định giới hạn sáng chế này theo cách bất kỳ cách nào. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng nhận ra rất các thông số không quan trọng mà có thể được thay đổi hoặc chỉnh sửa để thu được các kết quả gần như tương tự.

Ví dụ 1. Tổng hợp 4-(1*H*-pyrazol-4-yl)-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (5)



Klpt: khối lượng phân tử

Bước 1.4-Clo-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)methyl)-7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**3**)

Cho 4-clo-7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (hợp chất **1**, 600g, 3,91mol) và *N,N*-dimethylacetimid (DMAC, 9,6l) vào bình được lắp cửa nạp khí nitơ, phễu bổ sung, ống bảo vệ cảm biến nhiệt, và máy khuấy cơ học ở nhiệt độ phòng. Làm nguội hỗn hợp xuống 0 - 5°C trong bể đá/nước muối trước khi bổ sung từng phần natri hydrua rắn (NaH, 60% theo khối lượng, 174g, 4,35mol, 1,1 đương lượng) ở 0 - 5°C. Hỗn hợp phản ứng trở thành dung dịch sẫm màu sau 15 phút. Sau đó thêm vào từ từ trimethylsilyl etoxymethyl clorua (hợp chất **2**, SEM-Cl, 763ml, 4,31mol, 1,1 đương lượng) qua phễu bổ sung với tốc độ sao cho nhiệt độ phản ứng bên trong không vượt quá 5°C. Sau đó khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0 - 5°C trong 30 phút. Khi phản ứng được coi là hoàn toàn, được xác định bằng TLC và HPLC, dập tắt hỗn hợp phản ứng bằng nước (1l). Sau đó pha loãng hỗn hợp với nước (12l) và methyl *tert*-butyl ete (MTBE) (8l). Tách riêng hai lớp và chiết lớp nước bằng MTBE (8l). Rửa các lớp hữu cơ đã được gộp lại bằng nước (2 x 4l) và nước muối (4l) và dung môi được chuyển sang 1-butanol. Sử dụng dung dịch chứa sản phẩm thô (**3**) trong 1-butanol trong phản ứng tạo cặp Suzuki sau đó mà không tinh chế thêm. Theo cách khác, làm khô dung dịch hữu cơ chứa sản phẩm thô (**3**) trong MTBE bằng natri sulfat (Na₂SO₄). Loại bỏ các dung môi dưới môi trường áp suất giảm. Sau đó hòa tan phần cặn trong heptan (2l), lọc và nạp lên cột silicagel (SiO₂, 3,5kg), rửa giải bằng heptan (6l), 95% heptan/etyl axetat (12l), 90% heptan/etylaxetat (10l), và sau cùng là 80% heptan/etyla xetat (10l). Gộp và cô đặc các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn tinh khiết trong môi trường áp suất giảm để thu được 4-clo-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)methyl)-7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (hợp chất **3**, 987g, 1109,8g theo lý thuyết, hiệu suất 88,9%) dưới dạng dầu màu vàng nhạt mà một phần đông rắn thành dạng dầu rắn khi để yên ở nhiệt độ phòng. Đối với hợp chất **3**: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz) δ8,67 (s, 1H), 7,87 (d, 1H, *J* = 3,8Hz), 6,71 (d, 1H, *J* = 3,6Hz), 5,63 (s, 2H), 3,50 (t, 2H, *J* = 7,9Hz), 0,80 (t, 2H, *J* = 8,1Hz), 1,24 (s, 9H) ppm; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100MHz) δ151,3, 150,8, 150,7, 131,5, 116,9, 99,3, 72,9, 65,8, 17,1, - 1,48ppm; C₁₂H₁₈ClN₃OSi (MW 283,83), LCMS (EI) *m/e* 284/286 (M⁺ + H).

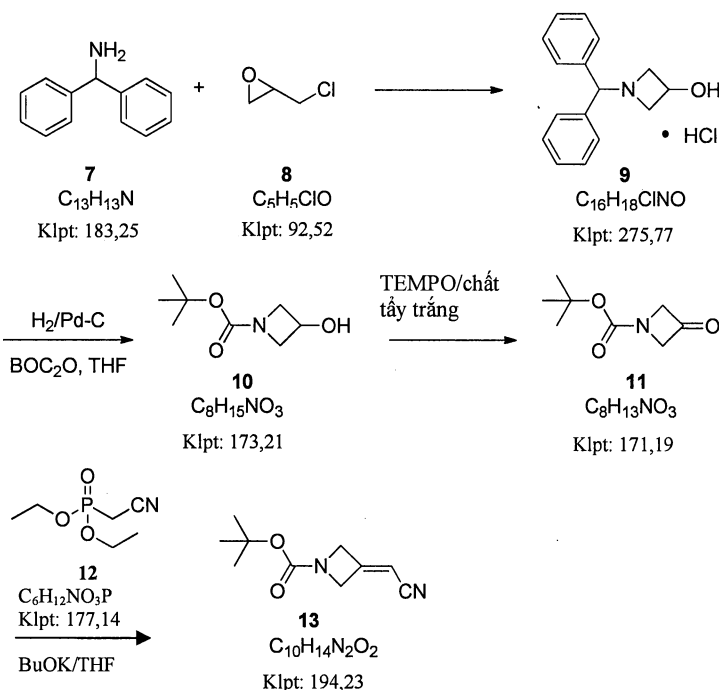
Bước 2. 4-(1H-Pyrazol-4-yl)-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin (5)

Nạp nước (H₂O, 9,0l), kali cacbonat rắn (K₂CO₃, 4461g, 32,28mol, 2,42 đương lượng), 4-clo-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin (hợp chất 3, 3597g, 12,67mol), 1-(1-etoxyetyl)-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol (hợp chất 4, 3550g, 13,34mol, 1,05 đương lượng), và 1-butanol (27l) vào bình phản ứng được lắp thanh khuấy trên đầu, bình ngưng, ống bảo vệ cảm biến nhiệt, và cửa nạp khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Khử khí trong hỗn hợp phản ứng thu được ba lần bằng cách lấp đầy bằng nitơ mỗi lần trước khi xử lý bằng tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) (Pd(PPh₃)₄, 46g, 0,040mol, 0,003 đương lượng) ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng thu được được đun đến khi hồi lưu nhẹ (khoảng 90°C) trong 1 – 4 giờ. Khi phản ứng được coi là hoàn toàn được xác định bằng HPLC, làm nguội từ từ hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ phòng trước khi lọc qua lớp xelit. Rửa lớp xelit bằng etylaxetat (2 x 2l) trước khi gộp dung dịch rửa và dịch lọc. Tách riêng hai lớp, và chiết lớp nước bằng etylaxetat (12l). Cô đặc các lớp hữu cơ đã được gộp lại trong môi trường áp suất giảm để loại bỏ các dung môi, và nạp trực tiếp hợp chất 4-(1-(1-etoxyetyl)-1H-pyrazol-4-yl)-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin (hợp chất 6) dạng thô trở lại bình phản ứng cùng với tetrahydrofuran (THF, 4,2l) để thực hiện phản ứng khử bảo vệ được xúc tiến bằng axit sau đó mà không tinh chế thêm.

Nạp nước (H₂O, 20,8l), và dung dịch nước HCl 10% (16,2l, 45,89mol, 3,44 đương lượng) vào huyền phù chứa 4-(1-(1-etoxyetyl)-1H-pyrazol-4-yl)-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrololo[2,3-d]pyrimidin (hợp chất 6) dạng thô, được điều chế theo mô tả ở trên, trong tetrahydrofuran (THF, 4,2l) vào bình phản ứng ở nhiệt độ phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng thu được ở 16 – 30°C trong 2 – 5 giờ. Khi phản ứng được coi là đã hoàn toàn nhờ phân tích HPLC, xử lý hỗn hợp phản ứng bằng dung dịch nước natri hydroxit (NaOH) 30% (4l, 50,42mol, 3,78 đương lượng) ở nhiệt độ phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng thu được ở nhiệt độ phòng trong 1 – 2 giờ. Gom các chất rắn lại bằng cách lọc và rửa bằng nước (2 x 5l). Nạp bánh lọc ẩm trở lại bình phản ứng với axetonitril (21,6l), và huyền phù thu được được đun đến hồi lưu nhẹ trong 1 – 2 giờ. Sau đó làm nguội từ từ dung dịch trong suốt tới nhiệt độ phòng bằng cách khuấy, và các chất rắn được kết tủa ra khỏi dung dịch bằng cách làm nguội. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ

phòng thêm 1-2 giờ. Gom các chất rắn lại bằng cách lọc, rửa bằng axetonitril (2 x 3,5l), và làm khô trong buồng sấy trong môi trường áp suất giảm ở 45 – 55°C đến khối lượng không đổi để tạo ra 4-(1*H*-pyrazol-4-yl)-7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin (hợp chất **5**, 3281,7g, 3996,8g theo lý thuyết, hiệu suất 82,1%) dưới dạng các chất rắn kết tinh màu trắng (99,5% diện tích bề mặt bằng phân tích HPLC). Đối với hợp chất **5**: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 13,41 (br. s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,67 (br. s, 1H), 8,35 (br. s, 1H), 7,72 (d, 1H, $J = 3,7\text{Hz}$), 7,10 (d, 1H, $J = 3,7\text{Hz}$), 5,61 (s, 2H), 3,51 (t, 2H, $J = 8,2\text{Hz}$), 0,81 (t, 2H, $J = 8,2\text{Hz}$), 0,13 (s, 9H) ppm; $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{Osi}$ (MW, 315,45), LCMS (EI) m/e 316 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ví dụ 2. *tert*-Butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (**13**)



Bước 1. 1-Benzhydrylazetidin-3-ol hydroclorua (**9**)

Xử lý dung dịch chứa diphenylmetanamin (hợp chất **7**, 2737g, 15,0mol, 1,04 đương lượng) trong metanol (MeOH, 6l) bằng 2-(clorometyl)oxiran (hợp chất **8**, 1330g, 14,5 mol) từ phễu bổ sung ở nhiệt độ phòng. Trong quá trình bổ sung ban đầu, chú ý phản ứng sẽ thu nhiệt nhẹ. Khuấy hỗn hợp phản ứng thu được ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày trước khi được làm ấm đến hồi lưu thêm 3 ngày nữa. Khi phân tích TLC cho thấy phản ứng được coi là đã hoàn toàn, đầu tiên làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ

phòng và sau đó xuống 0 – 5°C trong bể đá. Gôm các chất rắn lại bằng cách lọc và rửa bằng axeton (4l) để thu được mẻ thứ nhất chứa sản phẩm mong muốn dạng thô (hợp chất **9**, 1516g). Cô đặc dịch lọc trong môi trường áp suất giảm và pha loãng chất bán rắn thu được bằng axeton (1l). Sau đó gôm chất rắn này lại bằng cách lọc để thu được mẻ thứ hai chứa sản phẩm mong muốn dạng thô (hợp chất **9**, 221g). Thấy rằng sản phẩm thô, 1-benzhydrylazetidin-3-ol hydroclorua (hợp chất **9**, 1737g, 3998,7g theo lý thuyết, hiệu suất 43,4%) là đủ tinh khiết để sử dụng trong phản ứng sau đó mà không cần tinh chế thêm. Đối với hợp chất **9**: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300MHz), 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; $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClNO}$ (bazơ tự do của hợp chất **9**, $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}$ MW, 239,31), LCMS (EI) m/e 240 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Bước 2. *tert*-Butyl 3-hydroxyazetidin-1-carboxylat (**10**)

Khuấy huyền phù chứa 1-benzhydrylazetidin-3-ol hydroclorua (hợp chất **9**, 625g, 2,27mol) trong dung dịch nước natri cacbonat 10% (Na_2CO_3 , 5l) và diclorometan (CH_2Cl_2 , 5l) ở nhiệt độ phòng cho đến khi hoà tan hết tất cả các chất rắn. Tách riêng hai lớp, và chiết lớp nước bằng diclorometan (CH_2Cl_2 , 2l). Làm khô các phần chiết hữu cơ đã được gộp lại bằng natri sulfat (Na_2SO_4) và cô đặc trong môi trường áp suất giảm. Sau đó hòa tan bazơ tự do thô thu được của hợp chất **9** trong THF (6l) và cho dung dịch vào bình cao áp Parr lớn. Thêm di-*tert*-butyl dicacbonat (BOC_2O , 545g, 2,5mol, 1,1 đương lượng) và paladi (Pd) 20% trên cacbon (125g, độ ẩm 50%) vào bình cao áp Parr. Nạp vào bình đến 30psi với khí hydro (H_2) và khuấy trong khí quyển hydro ổn định (bình được nạp lại ba lần để duy trì áp suất ở 30psi) ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Khi phân tích HPLC cho thấy là phản ứng đã hoàn toàn (khí hydro không được hấp thụ thêm nữa), lọc hỗn hợp phản ứng bằng lớp xelit và rửa lớp xelit bằng THF (4l). Cô đặc dịch lọc trong môi trường áp suất giảm để loại bỏ dung môi và cho phần cặn lên trên cột Biotage 150 với lượng tối thiểu diclorometan (CH_2Cl_2). Rửa giải cột bằng etylaxetat 20 – 50% trong heptan và gom lại và kết hợp các phân đoạn chứa sản phẩm mong muốn tinh khiết (hợp chất **10**). Loại bỏ các dung môi trong môi trường áp suất giảm để tạo ra *tert*-butyl 3-hydroxyazetidin-1-carboxylat (hợp chất **10**, 357g, 393,2g theo lý thuyết, hiệu suất 90,8%) dưới dạng dầu không màu, đóng rắn khi để yên ở nhiệt độ phòng trong chân

không. Đối với hợp chất **10**: ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), δ 4,56 (m, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 1,43 (s, 9H) ppm.

Bước 3. *tert*-Butyl 3-oxoazetidin-1-carboxylat (**11**)

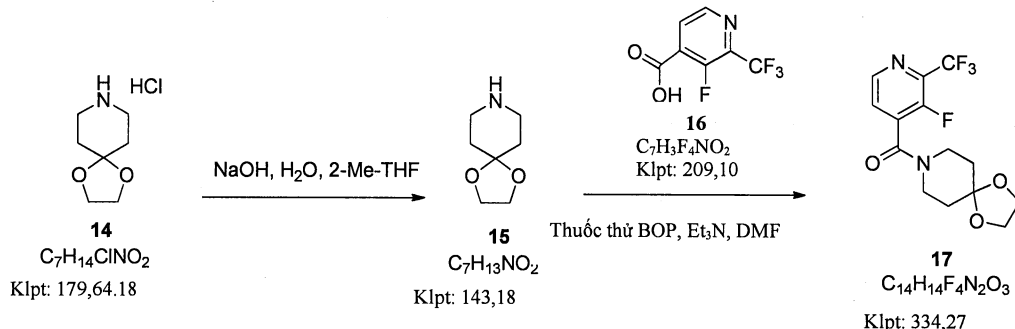
Làm nguội dung dịch chứa *tert*-butyl 3-hydroxyazetidin-1-carboxylat (hợp chất **10**, 50g, 289mmol) trong etylaxetat (400ml) xuống 0°C . Sau đó xử lý dung dịch thu được bằng TEMPO rắn (0,5g, 3,2mmol, 0,011 đương lượng) và dung dịch chứa kali bromua (KBr, 3,9g, 33,2mmol, 0,115 đương lượng) trong nước (60ml) ở $0 - 5^\circ\text{C}$. Trong khi duy trì nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng $0 - 5^\circ\text{C}$, bổ sung dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa (NaHCO_3 , 450ml) và dung dịch nước natri hypoclorit (NaClO , clo khả dụng 10 - 13%, 450ml) vào hỗn hợp. Ngay khi dung dịch natri hypoclorit được thêm vào, màu sắc của hỗn hợp phản ứng bị thay đổi ngay lập tức. Khi một lượng nửa của dung dịch natri hypoclorit được thêm vào, màu sắc của hỗn hợp phản ứng nhạt dần. Khi phân tích TLC cho thấy tất cả nguyên liệu khởi đầu đã được sử dụng hết, màu sắc của hỗn hợp phản ứng không còn thay đổi nữa. Sau đó pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng etylaxetat (EtOAc , 500ml) và hai lớp được tách riêng. Rửa lớp hữu cơ bằng nước (500ml) và dung dịch nước natri clorua bão hòa (500ml) và làm khô bằng natri sulfat (Na_2SO_4). Sau đó, loại bỏ dung môi trong môi trường áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, *tert*-butyl 3-oxoazetidin-1-carboxylat (hợp chất **11**, 48g, 49,47g theo lý thuyết, hiệu suất 97%), được thấy là đủ tinh khiết và được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Đối với hợp chất **11** thô: ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), δ 4,65 (s, 4H), 1,42 (s, 9H) ppm.

Bước 4. *tert*-Butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (**13**)

Bổ sung diethyl xyanometyl phosphat (hợp chất **12**, 745g, 4,20mol, 1,20 đương lượng) và tetrahydrofuran khan (THF, 9l) vào bình cầu bốn cổ được lắp ống bảo vệ cảm biến nhiệt, phễu bổ sung và ống bảo vệ nitơ ở nhiệt độ phòng. Làm lạnh dung dịch này bằng bể đá metanol xuống -14°C và bổ sung dung dịch kali *tert*-butoxit (*t*-BuOK) 1,0M trong tetrahydrofuran khan (THF, 3,85l, 3,85mol, 1,1 đương lượng) trong hơn 20 phút duy trì nhiệt độ phản ứng dưới -5°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng thu được trong 3 giờ ở -10°C và bổ sung dung dịch chứa 1-*tert*-butoxycarbonyl-3-azetidinon (hợp chất **11**, 600g,

3,50mol) trong tetrahydrofuran khan (THF, 2l) trong khoảng 2 giờ giữ nhiệt độ bên trong dưới -5°C . Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ từ -5°C đến -10°C trong khoảng hơn 1 giờ và sau đó làm ấm từ từ lên đến nhiệt độ phòng và khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Sau đó hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước (4,5l) và dung dịch nước natri clorua bão hòa (NaCl, 4,5l) và được chiết bằng etylaxetat (EtOAc, 2 x 9l). Các lớp hữu cơ đã được gộp lại được rửa bằng nước muối (6l) và làm khô bằng natri sulfat khan (Na_2SO_4). Loại bỏ dung môi hữu cơ trong môi trường áp suất giảm và pha loãng phần cặn bằng diclorometan (CH_2Cl_2 , 4l) trước khi hấp thụ trên cột silica gel (SiO_2 , 1,5kg). Sản phẩm thô, đã được hấp thụ trên silica gel, được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (SiO_2 , 3,5kg, rửa giải gradien 0-25% EtOAc/các hexan) để tạo ra *tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (hợp chất **13**, 414,7g, 679,8g theo lý thuyết, hiệu suất 61%) dưới dạng chất rắn màu trắng. Đối với hợp chất **13**: ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), δ 5,40 (m, 1H), 4,70 (m, 2H), 4,61 (m, 2H), 1,46 (s, 9H) ppm; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (MW, 194,23), LCMS (EI) m/e 217 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Ví dụ 3. (3-Flo-2-(triflorometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (**17**)



Bước 1. 1,4-Dioxa-8-azaspiro[4,5]decan (**15**)

Nạp natri hydroxit (NaOH , 1,4kg, 35mol) và nước (7l, 3,13kg, 17,43mol) vào bình phản ứng 30l được lắp cánh khuấy cơ học, phễu bổ sung và vách ngăn. Bổ sung axit 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan clohydric (hợp chất **14**, 3,13kg, 17,43mol) vào dung dịch thu được theo cách nêu trên. Khuấy hỗn hợp ở 25°C trong 30phút. Tiếp theo làm bão hòa dung dịch bằng natri clorua (1,3kg) và chiết bằng 2-metyl-tetrahydrofuran (3 x 7l). Làm khô lớp hữu cơ đã được gộp lại bằng natri sulfat khan (1,3kg), lọc và cô đặc

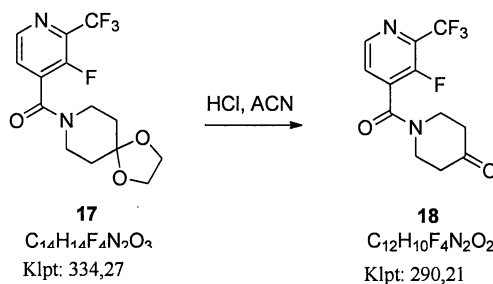
trong môi trường áp suất giảm (70mmHg) ở 50°C. Chung cất dầu màu vàng thu được nêu trên trong môi trường áp suất giảm (80mmHg, điểm sôi: 115°C đến 120°C) để thu được hợp chất **15** (2,34kg, 16,36mol, 93,8%) dưới dạng dầu trong suốt, được sử dụng trực tiếp trong phản ứng liên hợp tiếp theo.

Bước 2. (3-Flo-2-(triflorometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (**17**)

Cho axit 3-flo-2-(triflorometyl)isonicotinic (hợp chất **16**, 3,0kg, 14,35mol), benzotriazol-1-yloxytris(dimetylamino)phosphoni hexaflorophosphat (chất phản ứng BOP, 7,6kg, 17,2mol, 1,20 đương lượng) trong dimetylformamit (DMF, 18l) vào bình phản ứng 100l khô được lắp cánh khuấy cơ học, phễu bổ sung, nhiệt kế và đầu xả chân không. Bổ sung 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan (hợp chất **15**, 2,34kg, 16,36mol, 1,14 đương lượng) vào dung dịch thu được trong điều kiện khuấy hơn 20 phút. Sau đó thêm trietylamin (Et₃N, 4l, 28,67mol, 2,00 đương lượng) vào trong 1 giờ. Duy trì nhiệt độ nằm trong khoảng 5°C- 10°C trong khi quá trình thêm vào. Khuấy dung dịch màu nâu sẫm thu được theo cách nêu trên trong 12 giờ ở 20°C và sau đó làm lạnh xuống 10°C. Trong điều kiện khuấy mạnh, thêm lần lượt 18l dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 36l nước vào và giữ nhiệt độ dưới 15°C. Chất kết tủa (bánh lọc) thu được theo cách nêu trên được gom lại bằng cách lọc. Sau đó làm bão hòa pha nước bằng 12kg natri clorua rắn và chiết bằng EtOAc (2 x 18l). Rửa lớp hữu cơ đã được gộp lại lần lượt bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa (18l), và nước (2 x 18l). Bánh lọc thu được từ quá trình lọc trước đó được hòa tan trở lại trong pha hữu cơ. Rửa dung dịch màu nâu sẫm thu được theo cách ở trên hai lần, mỗi lần bằng 18l nước và sau đó cô đặc trong môi trường áp suất giảm (40 – 50°C, 30mm Hg) để thu được 5,0kg sản phẩm thô dưới dạng dầu màu nâu nhớt. Hòa tan sản phẩm thô **17** thu được trên đây trong EtOH (8,15l) ở 50°C. Thêm nước (16,3l) vào trong khoảng hơn 30 phút. Dung dịch màu nâu được tạo mầm tinh thể, được làm nguội xuống 20°C trong 3 giờ trong điều kiện khuấy và được khuấy ở 20°C trong 12 giờ. Lọc kết tủa được tạo ra, rửa bằng hỗn hợp gồm EtOH và nước (EtOH : H₂O = 1 : 20, 2l) và làm khô trong môi trường áp suất giảm (50mmHg) ở 60°C trong 24 giờ để tạo ra (3-flo-2-(triflorometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (hợp chất **17**, 3,98kg, 11,92mol, 83,1%) là bột màu trắng. Đối với hợp chất

17: ^1H NMR (300MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4,68\text{Hz}$, 1 H, NCH trong pyridin), 7,92 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,68\text{Hz}$, $^4J_{\text{HF}} = 4,68\text{Hz}$, 1 H, NCCH trong pyridin), 3,87-3,91 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,70 (br s, 2 H, một của NCH_2 trong vòng piperidin, một của NCH_2 khác trong vòng piperidin, cả hai nằm ở vị trí trục), 3,26 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,86\text{Hz}$, 2 H, một của NCH_2 trong vòng piperidin, một của NCH_2 khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí xích đạo), 1,67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5,86\text{Hz}$, 2 H, một của NCCH_2 trong vòng piperidin, một của NCCH_2 khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí xích đạo), 1,58 (br s, 2 H, một của NCCH_2 trong vòng piperidin, một của NCCH_2 khác trong vòng piperidin, cả hai ở vị trí trục) ppm; ^{13}C NMR (75MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 161,03 (N-C=O), 151,16 (d, $^1J_{\text{CF}} = 266,03\text{Hz}$, C-F), 146,85 (d, $^4J_{\text{CF}} = 4,32\text{Hz}$, NCH trong pyridin), 135,24 (d, $^2J_{\text{CF}} = 11,51\text{Hz}$, C-C=O), 135,02 (vạch bốn, $^2J_{\text{CF}} = 34,57\text{Hz}$, NCCF_3), 128,24 (d, $^4J_{\text{CF}} = 7,48\text{Hz}$, NCCH trong pyridin), 119,43 (d×vạch bốn, $^1J_{\text{CF}} = 274,38\text{Hz}$, $^3J_{\text{CF}} = 4,89\text{Hz}$, CF_3), 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 (282MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ -64,69 (d, $^4J_{\text{FF}} = 15,85\text{Hz}$, F_3C), -129,26 (d×vạch bốn, $^4J_{\text{FF}} = 15,85\text{Hz}$, $^4J_{\text{FH}} = 3,96\text{Hz}$, FC) ppm; $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_3$ (MW, 334,27), LCMS (EI) m/e 335,1 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

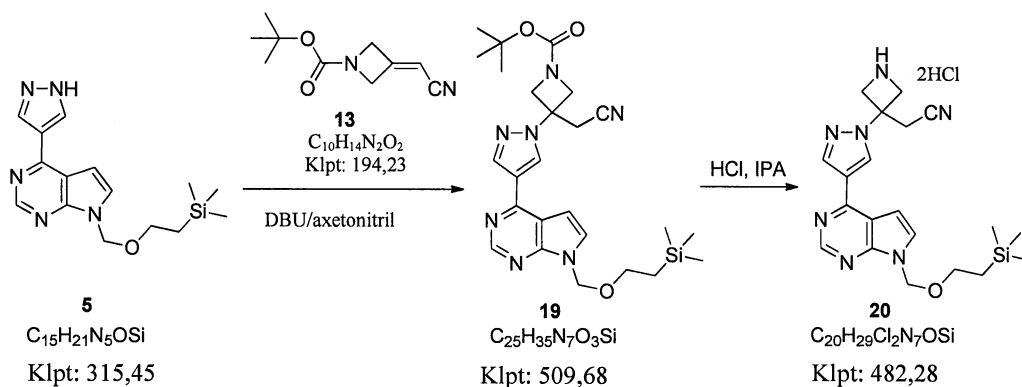
Ví dụ 4. (3-Flo-2-(triflorometyl)pyridin-4-yl) (1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (**18**)



Cho (3-flo-2-(triflorometyl)pyridin-4-yl)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)metanon (hợp chất **17**, 100g, 0,299mol) trong axetonitril (ACN, 400ml) vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 5l được lắp cánh khuấy cơ học, cặp nhiệt độ, phễu bổ sung và cửa nạp khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Làm nguội dung dịch thu được xuống dưới 10°C . Thêm dung dịch nước axit clohydric 6,0N (HCl, 450ml, 2,70mol, 9,0 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng, đồng thời duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C . Sau đó làm ấm hỗn hợp phản ứng thu được đến nhiệt độ phòng và đưa từ từ một lượng bổ sung của dung dịch

nước axit clohydric 6,0N (HCl, 1050ml, 6,30mol, 21,0 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ qua phễu bỏ sung. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống 0°C trước khi xử lý bằng dung dịch nước natri hydroxit 30% (NaOH, 860ml, 8,57mmol, 28,6 đương lượng) đồng thời duy trì nhiệt độ bên trong dưới 10°C. Sau đó làm ấm hỗn hợp phản ứng thu được đến nhiệt độ phòng trước khi bỏ sung natri bicacbonat rắn (NaHCO₃, 85,0g, 1,01mol, 3,37 đương lượng) trong 1 giờ. Sau đó chiết hỗn hợp bằng EtOAc (2 x 1,2l), và rửa pha hữu cơ kết hợp bằng dung dịch nước natri clorua 16% (2 x 800ml) và cô đặc tới khi còn xấp xỉ 1,0l bằng cách chưng cất chân không. Thêm heptan (2,1l) vào phần cặn, và cô đặc hỗn hợp thu được đến 1,0l bằng cách chưng cất chân không. Thêm heptan (2,1l) vào hỗn hợp đã cô đặc. Sau đó cô đặc huyền phù màu trắng thu được đến 1,0l bằng cách chưng cất chân không. Sau đó thêm methyl *tert*-butyl ete (MTBE, 1,94l) vào huyền phù màu trắng này. Đun nóng phần vẫn đục màu trắng đến 40°C để tạo ra dung dịch trong suốt. Cô đặc dung dịch thu được tới khi còn khoảng 1,0l bằng cách chưng cất chân không. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Gom chất kết tủa màu trắng lại bằng cách lọc hút chân không. Rửa bánh lọc bằng heptan (400ml) và làm khô trên bộ lọc trong môi trường nitơ bằng cách hút chân không để tạo ra hợp chất **18** (78,3g, 90,1%) dưới dạng chất rắn trắng nhờ. Đối với hợp chất **18**: ¹H NMR (300MHz, (CD₃)₂SO) δ 8,68 (d, ³J_{HH} = 4,69Hz, 1 H, NCH trong pyridin), 7,97 (dd, ³J_{HH} = 4,69Hz, ⁴J_{HF} = 4,69Hz, 1 H, NCCH trong pyridin), 3,92 (br s, 2 H, một của NCH₂ trong vòng piperidin, một của NCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai đều ở vị trí trục), 3,54 (t, ³J_{HH} = 6,15Hz, 2 H, một của NCH₂ trong vòng piperidin, một của NCH₂ khác trong vòng piperidin, cả hai đều ở vị trí xích đạo), 2,48 (t, ³J_{HH} = 6,44Hz, 2 H, NCCH₂), 2,34 (t, ³J_{HH} = 6,15Hz, 2 H, NCCH₂) ppm; ¹³C NMR (75MHz, (CD₃)₂SO) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-C=O), 151,26 (d, ¹J_{CF} = 266,89Hz, C-F), 146,90 (d, ⁴J_{CF} = 6,05Hz, NCH trong pyridin), 135,56 (C-C=O), 134,78 -135,56 (m, NCCF₃), 128,27 (d, ³J_{CF} = 7,19Hz, NCCH trong pyridin), 119,52 (d× vạch bốn, ¹J_{CF} = 274,38Hz, ³J_{CF} = 4,89Hz, CF₃), 45,10 (NC trong vòng piperidin) ppm, một cacbon (NCC trong vòng piperidin) khuyết do trùng với (CD₃)₂SO; ¹⁹F NMR (282MHz, (CD₃)₂SO) δ -64,58 (d, ⁴J_{FF} = 15,85Hz, F₃C), -128,90 (d× vạch bốn, ⁴J_{FF} = 15,85Hz, ⁴J_{FH} = 4,05Hz, FC) ppm; C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (MW, 290,21), LCMS (EI) *m/e* 291,1 (M⁺ + H).

Ví dụ 5. 3-[4-(7-{[2-(Trimethylsilyl)etoxy]metyl}-7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl} axetonitril dihydroclorua (20)



Bước 1. *tert*-Butyl 3-(xyanometyl)-3-(4-(7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-1-carboxylat (19)

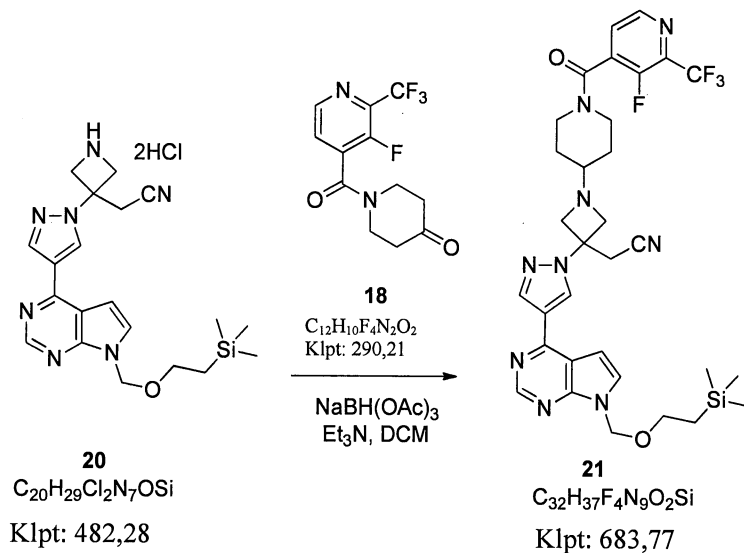
Cho 4-(1H-pyrazol-4-yl)-7-((2-(trimethylsilyl)etoxy)metyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (hợp chất 5, 4,50kg, 14,28mol), *tert*-butyl 3-(xyanometylen)azetidin-1-carboxylat (hợp chất 13, 3,12kg, 16,08mol, 1,126 đương lượng) trong axetonitril (9l) vào bình phản ứng khô 30l được lắp cánh khuấy cơ học, nhiệt kế, phễu bổ sung và cửa xả chân không ở $20 \pm 5^\circ C$. Thêm 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU, 225ml, 1,48mol, 0,10 đương lượng) vào huyền phù màu hồng thu được trong 40phút. Giữ nhiệt độ mẻ trong khoảng $10^\circ C$ - $20^\circ C$ trong quá trình thêm. Khuấy dung dịch màu nâu thu được ở $20^\circ C$ trong 3 giờ. Sau khi phản ứng hoàn toàn, thêm nước (18l) vào trong điều kiện khuấy trong khoảng 80 phút ở $20^\circ C$. Hỗn hợp được tạo mầm kết tinh và khuấy hỗn hợp đã được tạo mầm kết tinh này ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Gom các chất rắn lại bằng cách lọc và rửa bánh lọc bằng hỗn hợp gồm axetonitril và nước (1 : 2, 9l) và làm khô trong lò chân không bằng cách sục khí nitơ trong 12 giờ ở $60^\circ C$ để tạo ra sản phẩm thô (hợp chất 19, 7,34kg) dưới dạng bột màu vàng nhạt. Hòa tan sản phẩm thô thu được ở trên trong metyl *tert*-butyl ete (MTBE, 22l) ở $60^\circ C$ trong bình phản ứng 50l được lắp cánh khuấy cơ học, nhiệt kế, phễu bổ sung và vách ngăn. Bổ sung hexan (22l) vào trong 1giờ ở $60^\circ C$. Sau đó dung dịch được tạo mầm kết tinh, làm nguội dung dịch tới $20^\circ C$ trong 3giờ và khuấy ở $20^\circ C$ trong 12 giờ. Gom chất kết tủa lại bằng cách lọc. Rửa bánh lọc thu được bằng hỗn hợp gồm MTBE và hexan (1 : 15, 3l) và làm khô trong lò chân

không trong 10 giờ ở 50°C để tạo ra hợp chất **19** (6,83kg, 13,42mol, 94,0%) dưới dạng bột màu trắng. Đối với hợp chất **19**: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8,87 (s, 1H), 8,46 (d, $J = 0,6\text{Hz}$, 1H), 8,36 (d, $J = 0,7\text{Hz}$, 1H), 7,44 (d, $J = 3,7\text{Hz}$, 1H), 6,82 (d, $J = 3,7\text{Hz}$, 1H), 5,69 (s, 2H), 4,57 (d, $J = 9,6\text{Hz}$, 2H), 4,32 (d, $J = 9,5\text{Hz}$, 2H), 3,59 – 3,49 (m, 2H), 3,35 (s, 2H), 1,49 (s, 9H), 0,96 – 0,87 (m, 2H), -0,03 – -0,10 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ 157,22, 153,67, 153,24, 151,62, 142,13, 130,16, 129,67, 124,47, 116,72, 115,79, 102,12, 82,54, 74,23, 68,01, 60,25, 58,23, 29,65, 29,52, 19,15, -0,26ppm; $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_3\text{Si}$ (MW, 509,68), LCMS (EI) m/e 510,1 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Bước 2. 3-[4-(7-{[2-(Trimethylsilyl)etoxy]metyl}-7H-pyrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}axetonitril dihydroclorua (**20**)

Cho hợp chất **19** (55,0g, 0,108mol) và metanol (MeOH, 440ml) vào bình đáy tròn 4 cổ 2l được lắp cánh khuấy cơ học, cặp nhiệt độ, phễu bổ sung và cửa nạp khí nitơ ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Khuấy phản vẩn đục màu trắng thu được trong 20 phút ở nhiệt độ phòng để tạo ra dung dịch màu vàng nhạt. Sau đó bổ sung dung dịch axit clohydric (HCl) trong isopropanol (5,25M, 165ml, 0,866mol, 8,02 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng qua phễu bổ sung trong 5 phút. Sau đó đun nóng hỗn hợp phản ứng thu được đến 40°C bằng vỏ gia nhiệt. Sau 2 giờ ở 40°C , thêm nước (165ml, 9,17mol, 84,8 đương lượng) vào hỗn hợp phản ứng qua phễu bổ sung để tạo ra dung dịch màu xanh lá cây nhạt ở 40°C . Thêm methyl *tert*-butyl ete (MTBE, 440ml) vào hỗn hợp thu được qua phễu bổ sung ở 40°C . Làm nguội từ từ hỗn hợp thu được xuống 10°C . Gom các chất rắn lại bằng cách lọc và rửa bằng MTBE (2 x 220ml). Làm khô các chất rắn màu trắng trong bộ lọc trong môi trường nitơ bằng cách hút chân không trong 18 giờ để tạo ra hợp chất **20** (52,2g, hàm lượng nước KF 5,42%, hiệu suất 94,9%). Đối với hợp chất **20**: ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 10,39 (brs, 1H), 10,16 (brs, 1H), 9,61 (s, 1H), 9,12 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,27 – 8,21 (d, $J = 3,8\text{Hz}$, 1H), 7,72 – 7,66 (d, $J = 3,8\text{Hz}$, 1H), 5,82 (s, 2H), 4,88 – 4,77 (m, 2H), 4,53 – 4,44 (m, 2H), 4,12 (s, 2H), 3,69 – 3,60 (m, 2H), 0,98 – 0,89 (m, 2H), 0,01 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 151,25, 146,45, 145,09, 140,75, 133,38, 132,44, 116,20, 116,09, 112,79, 102,88, 73,07, 66,14, 59,16, 53,69, 26,44, 17,15, -1,36ppm; $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_3\text{Si}$ (bazơ tự do của hợp chất **20**, $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{OSi}$, MW 409,56), LCMS (EI) m/e 410,2 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

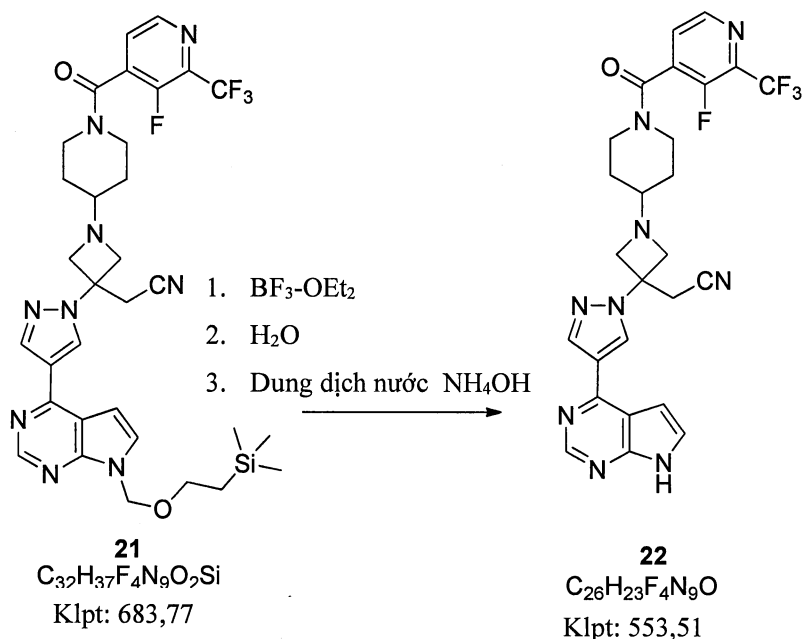
Ví dụ 6. 2-(1-(1-(3-Flo-2-(triflorometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)-3-(4-(7-((2-(trimetylsilyl)etoxy)metyl)-7*H*-pyrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)-1*H*-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (21)



Cho hợp chất **20** (3,24kg, 6,715mol) và diclorometan (32l) vào bình phản ứng khô 100l được lắp cánh khuấy cơ học, cặp nhiệt độ, bình ngưng, và cửa nạp khí nitơ ở $20 \pm 5^\circ C$. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút trước khi xử lý bằng triethylamin (TEA, 1,36kg, 13,44mol, 2,00 đương lượng) với tốc độ bổ sung sao cho giữ được nhiệt độ bên trong ở $15 - 30^\circ C$. Sau đó, bổ sung hợp chất **18** (2,01kg, 6,926mol, 1,03 đương lượng) vào bình phản ứng ở nhiệt độ phòng. Sau 10 phút, thêm từng phần nhỏ natri triaxetoxylborohydrua ($NaBH(OAc)_3$, 2,28kg, 10,75mol, 1,60 đương lượng) vào bình phản ứng trong 1 giờ đồng thời duy trì nhiệt độ bên trong ở $15 - 30^\circ C$. Khuấy hỗn hợp phản ứng thu được ở $15 - 30^\circ C$ thêm một giờ nữa. Khi phản ứng amin hóa khử được coi là hoàn toàn, xử lý hỗn hợp phản ứng bằng dung dịch nước natri bicacbonat 4% ($NaHCO_3$, 32l) để điều chỉnh độ pH đến 7 - 8. Sau khi khuấy hỗn hợp trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, tách riêng hai pha. Chiết pha nước bằng diclorometan (29l). Rửa pha hữu cơ kết hợp lần lượt bằng dung dịch nước axit clohydric 0,1N (16l), dung dịch nước natri bicacbonat 4% (16l), dung dịch nước natri clorua 8% (2 x 16l). Cô đặc và lọc một phần pha hữu cơ thu được. Dịch lọc được trao đổi dung môi bằng cách thêm từ từ axetonitril (65l) trong chân không. Gom các chất rắn màu trắng bằng cách lọc, rửa bằng

axetonitril (10l) và làm khô ở 40 - 50°C trong lò chân không bằng cách xục khí nitơ để tạo ra hợp chất **21** (4,26kg, 6,23mol, 92,9%). Đối với hợp chất **21**: ^1H NMR (500MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,84 (s, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,66 (d, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,90 (t, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 7,78 (d, $J = 3,7\text{Hz}$, 1H), 7,17 (d, $J = 3,7\text{Hz}$, 1H), 5,63 (s, 2H), 4,07 (dt, $J = 11,1, 4,9\text{Hz}$, 1H), 3,75 (d, $J = 7,8\text{Hz}$, 2H), 3,57 (dd, $J = 10,2, 7,8\text{Hz}$, 2H), 3,55 (s, 2h), 3,52 (dd, $J = 8,5, 7,4\text{Hz}$, 2H), 3,41 (dq, $J = 13,3, 4,3\text{Hz}$, 1H), 3,26 (t, $J = 10,0\text{Hz}$, 1H), 3,07 (ddd, $J = 13,1, 9,4, 3,2\text{Hz}$, 1H), 2,56 (dt, $J = 8,5, 4,7\text{Hz}$, 1H), 1,81 – 1,73 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,29 (m, 1H), 1,21 (m, 1H), 0,82 (dd, $J = 8,5, 7,4\text{Hz}$, 2H), -0,12 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 161,68, (154,91, 152,27), 153,08, 152,69, 151,53, 147,69, 140,96, (136,19, 136,02), (136,48, 136,36, 136,13, 136,0, 135,78, 135,66, 135,43, 135,32), 131,43, 130,84, 129,03, (126,17, 123,42, 120,69), 117,99, 122,77, 118,78, 114,71, 102,02, 73,73, 67,04, 62,86, 61,88, 58,51, 45,63, 30,03, 29,30, 28,60, 18,52, 0,00ppm; $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_2\text{Si}$ (MW, 683,77), LCMS (EI) m/e 684,2 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ví dụ 7. 2-(3-(4-(7H-Pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitril (**22**)

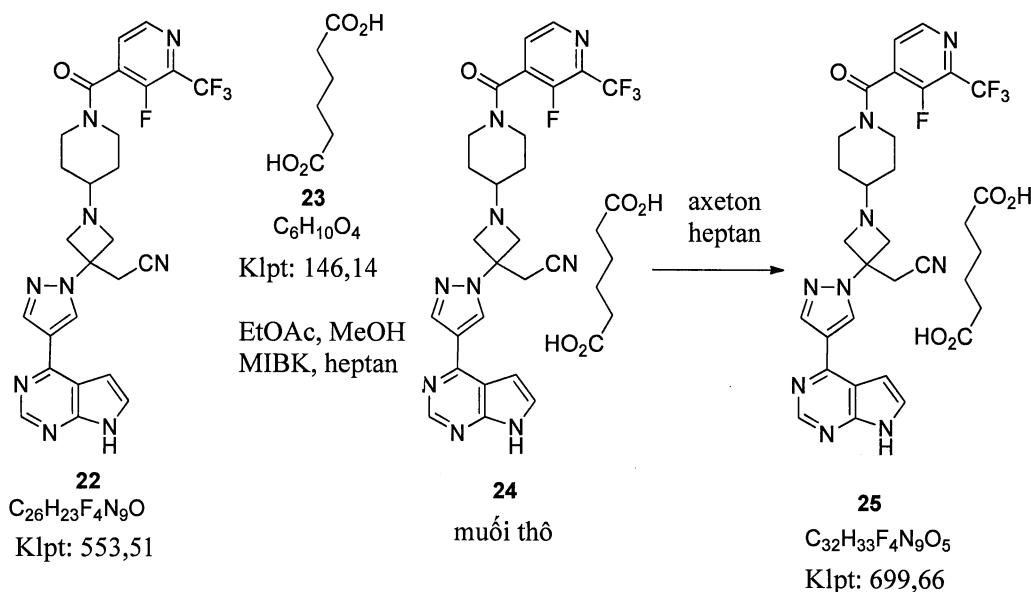


Cho hợp chất **21** (9,25g, 13,52mmol, hàm lượng nước KF 3,50%) và axetonitril (74ml) vào bình đáy tròn 4 cổ dung tích 250ml được lắp cánh khuấy cơ học, cấp nhiệt độ, phễu bổ sung và cửa nạp khí nitơ ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Làm nguội huyền phù màu trắng thu được đến dưới 5°C . Sau đó thêm bo triflorua dietyl eterat ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, 6,46ml,

51,37mmol, 3,80 đương lượng) vào với tốc độ sao cho duy trì nhiệt độ bên trong dưới 5,0°C. Sau đó làm ấm hỗn hợp phản ứng lên $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Sau khi khuấy ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 18 giờ, làm nguội hỗn hợp phản ứng tới 0 - 5°C và đưa một lượng $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,34ml, 2,70mmol, 0,2 đương lượng) nữa vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ dưới 5,0°C. Làm ấm hỗn hợp phản ứng thu được lên $20 \pm 5^\circ\text{C}$, và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng thêm 5 giờ nữa. Sau đó, làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống 0 - 5°C trước khi bổ sung nước (12,17ml, 0,676mol, 50 đương lượng). Giữ nhiệt độ bên trong ở dưới 5,0°C trong khi thêm vào nước. Làm ấm hỗn hợp thu được đến $20 \pm 5^\circ\text{C}$ và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau đó làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống 0 - 5°C và thêm dung dịch nước amoni hydroxit (NH_4OH , 5N, 121,7mmol, 9,0 đương lượng) vào. Trong khi bổ sung dung dịch nước amoni hydroxit, duy trì nhiệt độ bên trong ở dưới 5,0°C. Làm ấm hỗn hợp phản ứng thu được đến $20 \pm 5^\circ\text{C}$ và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Khi phản ứng khử bảo vệ SEM được coi là hoàn toàn, lọc hỗn hợp phản ứng, và rửa các chất rắn bằng EtOAc (9,25ml). Gộp lại các phần dịch lọc và pha loãng bằng EtOAc (74ml). Rửa dung dịch hữu cơ đã pha loãng bằng dung dịch nước natri clorua 13% (46,2ml). Sau đó pha loãng pha hữu cơ bằng EtOAc (55,5ml) trước khi cô đặc đến thể tích tối thiểu trong môi trường áp suất giảm. Thêm EtOAc (120ml) vào phần cặn, và khuấy dung dịch thu được ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 30 phút. Sau đó, rửa dung dịch bằng dung dịch nước natri bicacbonat 7% (2 x 46ml) và dung dịch nước natri bicacbonat 13% (46ml). Pha loãng pha hữu cơ thu được bằng EtOAc (46ml) và xử lý bằng nước (64ml) ở $50 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 30 phút. Làm nguội hỗn hợp đến $20 \pm 5^\circ\text{C}$ và tách riêng hai pha. Xử lý pha hữu cơ bằng nước (64ml) ở $50 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 30 phút lần thứ hai. Làm nguội hỗn hợp tới $20 \pm 5^\circ\text{C}$ và tách riêng hai pha. Cô đặc pha hữu cơ thu được để tạo ra hợp chất thô **22** (bazơ tự do), tinh chế tiếp bằng sắc ký cột (SiO_2 , 330g, rửa giải theo gradient bằng MeOH 0 - 10% trong EtOAc) để tạo ra bazơ tự do tinh khiết theo phép phân tích (hợp chất **22**, 7,00g, 93,5%) dưới dạng chất rắn màu trắng nhò. Đối với hợp chất **22**: ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12,17 (d, $J = 2,8\text{Hz}$, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,70 (m, 2H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 7,63 (dd, $J = 3,6, 2,3\text{Hz}$, 1H), 7,09 (dd, $J = 3,6, 1,7\text{Hz}$, 1H), 4,10 (m, 1H), 3,78 (d, $J = 7,9\text{Hz}$, 2H), 3,61 (t, $J = 7,9\text{Hz}$, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,46 (m, 1H), 3,28 (t, $J = 10,5\text{Hz}$, 1H), 3,09 (ddd, $J = 13,2, 9,5, 3,1\text{Hz}$, 1H), 2,58 (m, 1H), 1,83 – 1,75 (m, 1H), 1,70 – 1,63 (m, 1H), 1,35 – 1,21 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (101MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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, 27,19ppm; $C_{26}H_{23}F_4N_9O$ (MW, 553,51), LCMS (EI) m/e 554,1 ($M^+ + H$).

Ví dụ 8. 2-(3-(4-(7H-Pyrido[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 (25)



Bước 1. Muối thô 2-(3-(4-(7H-Pyrido[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 (24)

Tuân theo quy trình điều chế hợp chất **22** trong Ví dụ 7, ngoại trừ việc pha hữu cơ cuối cùng được cô đặc bằng cách chưng cất chân không đến thể tích tối thiểu để tạo ra hợp chất thô **22**, hợp chất này không được phân tách mà được sử dụng trực tiếp trong quy trình điều chế muối adipat tiếp theo. Bổ sung metanol (200ml) vào phần cặn được cô đặc mà chứa hợp chất **22** thô ở nhiệt độ phòng. Cô đặc hỗn hợp bằng cách chưng cất chân không đến thể tích tối thiểu. Sau đó bổ sung metanol (75ml) vào phần cặn và đun hồi lưu dung dịch thu được trong 2 giờ. Thêm methyl isobutyl keton (MIBK, 75ml) vào dung dịch và chưng cất hỗn hợp thu được trong chân không đến khoảng 30ml trong khi duy trì nhiệt độ bên trong ở 40 - 50°C. Bổ sung metanol (75ml) vào và đun hồi lưu hỗn hợp thu được trong 2 giờ. Bổ sung MIBK (75ml) vào dung dịch này. Chưng cất hỗn hợp

lần nữa trong chân không đến khoảng 30ml đồng thời duy trì nhiệt độ bên trong ở 40 - 50°C. Dung dịch này được bổ sung thêm dung dịch axit adipic (hợp chất **23**, 2,15g, 14,77mmol) trong metanol (75ml). Sau đó, đun hồi lưu dung dịch thu được trong 2 giờ. Bổ sung MIBK (75ml) vào. Chung cất hỗn hợp trong chân không đến khoảng 60ml trong khi giữ nhiệt độ bên trong ở 40 - 50°C. Ngừng đun nóng và heptan (52,5ml) được bổ sung vào trong 1 - 2 giờ. Khuấy hỗn hợp thu được ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 3 - 4 giờ. Gom kết tủa trắng lại bằng cách lọc, và rửa bánh lọc bằng heptan (2 x 15ml). Làm khô chất rắn trên bộ lọc trong môi trường nitơ bằng cách hút chân không ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 12 giờ để tạo ra hợp chất **24** (muối adipat thô, 8,98g, 12,84mmol, 95,0%). Đối với hợp chất **24**: ^1H NMR (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12,16 (s, 1H), 12,05 (brs, 2H), 8,85 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,69 (d, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 7,63 (dd, $J = 3,6, 2,3\text{Hz}$, 1H), 7,09 (dd, $J = 3,6, 1,7\text{Hz}$, 1H), δ 4,11 (dt, $J = 11,0, 4,4\text{Hz}$, 1H), 3,77 (d, $J = 7,8\text{Hz}$, 2H), 3,60 (t, $J = 7,8\text{Hz}$, 2H), 3,58 (s, 2H), 3,44 (dt, $J = 14,4, 4,6\text{Hz}$, 1H), 3,28 (t, $J = 10,4\text{Hz}$, 1H), 3,09 (ddd, $J = 13,2, 9,6, 3,2\text{Hz}$, 1H), 2,58 (tt, $J = 8,6, 3,5\text{Hz}$, 1H), 2,28 - 2,17 (m, 4H), 1,83 - 1,74 (m, 1H), 1,67 (d, $J = 11,0\text{Hz}$, 1H), 1,59 - 1,46 (m, 4H), 1,37 - 1,21 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (101MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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, 24,07ppm; $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_5$ (Khối lượng phân tử: 699,66; hợp chất **24**: $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}$, MW 553,51), LCMS (EI) m/e 554,0 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Bước 2. 2-(3-(4-(7H-Pyrololo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-1-(1-(3-fluoro-2-(triflorometyl)isonicotinoyl)piperidin-4-yl)azetidin-3-yl)axetonitriladipat (**25**)

Thêm hợp chất **24** (3,40kg, 4,86mol) và axeton (23,8l) vào bình phản ứng khô 100l được lắp cánh khuấy cơ học, cặp nhiệt độ, phễu bổ sung và cửa nạp khí nitơ. Đun nóng phần vẫn đục màu trắng thu được đến 55 - 60°C để tạo ra dung dịch trong suốt. Lọc dung dịch thu được qua bộ lọc nối tiếp đến bình phản ứng 100l khác. Lọc heptan (23,8l) qua bộ lọc nối tiếp đến bình phản ứng 50l riêng biệt. Sau đó nạp heptan đã được lọc vào dung dịch axeton trong bình phản ứng 100l với tốc độ sao cho duy trì nhiệt độ bên trong ở 55 - 60°C. Sau đó, làm nguội hỗn hợp phản ứng trong bình phản ứng 100l

xuống $20 \pm 5^\circ\text{C}$ và khuấy ở $20 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 16 giờ. Gom kết tủa màu trắng lại bằng cách lọc và rửa bánh lọc bằng heptan ($2 \times 5,1\text{l}$) và làm khô trên bộ lọc trong môi trường nitơ bằng cách hút chân không. Tiếp tục làm khô chất rắn trong lò chân không ở $55 - 65^\circ\text{C}$ bằng cách xục khí nitơ để tạo ra hợp chất **25** ($3,11\text{kg}$, $92,2\%$) dưới dạng bột màu trắng đến màu trắng nhò. Đối với hợp chất **25**: ^1H NMR (400MHz , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12,16 (s, 1H), 12,05 (brs, 2H), 8,85 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,69 (d, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, $J = 4,7\text{Hz}$, 1H), 7,63 (dd, $J = 3,6, 2,3\text{Hz}$, 1H), 7,09 (dd, $J = 3,6, 1,7\text{Hz}$, 1H), δ 4,11 (dt, $J = 11,0, 4,4\text{Hz}$, 1H), 3,77 (d, $J = 7,8\text{Hz}$, 2H), 3,60 (t, $J = 7,8\text{Hz}$, 2H), 3,58 (s, 2H), 3,44 (dt, $J = 14,4, 4,6\text{Hz}$, 1H), 3,28 (t, $J = 10,4\text{Hz}$, 1H), 3,09 (ddd, $J = 13,2, 9,6, 3,2\text{Hz}$, 1H), 2,58 (tt, $J = 8,6, 3,5\text{Hz}$, 1H), 2,28 – 2,17 (m, 4H), 1,83 – 1,74 (m, 1H), 1,67 (d, $J = 11,0\text{Hz}$, 1H), 1,59 – 1,46 (m, 4H), 1,37 – 1,21 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (101MHz , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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, 24,07ppm; $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_5$ (khối lượng phân tử: 699,66; bazơ tự do: $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}$ (MW, 553,51), LCMS (EI) m/e 554,0 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Ví dụ A: Thử nghiệm kinaza JAK trong ống nghiệm

Hợp chất có công thức I ở đây đã được kiểm tra hoạt tính ức chế các đích JAK theo thử nghiệm *in vitro* dưới đây mà đã được mô tả trong tài liệu: 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) của người với đuôi His ở đầu cùng N được biểu hiện bằng cách sử dụng baculovirut trong các tế bào côn trùng và được tinh chế. Hoạt tính xúc tác của JAK1 và JAK2 được phân tích bằng cách đo mức phosphoryl hóa của peptit đã biotin hóa. Peptit đã phosphoryl hóa này được phát hiện bằng huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất (homogenous time resolved fluorescence - HTRF). Các giá trị IC_{50} của các hợp chất được đo cho mỗi kinaza trong các phản ứng 40microL chứa enzym này, ATP và peptit 500nM trong đệm Tris 50mM (độ pH=7,8) với NaCl 100mM, DTT 5mM, và BSA 0,1 mg/mL (0,01%). Đối các phép đo IC_{50} 1mM, nồng độ ATP trong các phản ứng là 1 mM. Các phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và sau đó được dừng lại bằng

20 μ L EDTA 45mM, SA-APC 300 nM, Eu-Py20 6 nM trong đệm phân tích (do hãng Perkin Elmer, Boston, MA cung cấp). Sự liên kết với kháng thể được đánh dấu bằng Europium diễn ra trong 40 phút và tín hiệu HTRF được đo trên máy đọc đĩa Fusion (Fusion plate reader) (do hãng Perkin Elmer, Boston, MA cung cấp). Hợp chất theo Ví dụ 1 và muối của axit adipic có IC₅₀ đối với JAK1 là ≤ 5 nM (được đo ở nồng độ ATP là 1 mM) với tỷ số JAK2/JAK1 là > 10 (được đo ở nồng độ ATP là 1 mM).

Ví dụ B: Các thử nghiệm tế bào

Các dòng tế bào ung thư phụ thuộc vào các xytokin và theo đó, phụ thuộc vào quá trình chuyển đổi tín hiệu JAK/STAT, để sinh trưởng, có thể được đặt lên đĩa, với 6000 tế bào mỗi giếng (dạng đĩa 96 giếng) trong RPMI 1640, FBS 10%, và xytokin thích hợp 1ng/mL. Có thể bổ sung các hợp chất vào các tế bào trong DMSO/môi trường (nồng độ DMSO cuối cùng là 0,2%) và ủ trong 72 giờ ở 37°C, CO₂ 5%. Đánh giá tác dụng của hợp chất đối với khả năng sống sót của tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm phân tích khả năng sống của tế bào thông qua ánh sáng phát quang của thuốc thử CellTiter-Glo (Promega), tiếp theo là định lượng TopCount (do hãng Perkin Elmer, Boston, MA cung cấp). Đánh giá song song các tác động ngoài đích có thể có của các hợp chất bằng cách sử dụng dòng tế bào không được điều khiển bởi JAK với cùng chỉ thị thử nghiệm. Tất cả các thí nghiệm thường được thực hiện lặp lại hai lần.

Các dòng tế bào ở trên có thể cũng được sử dụng để đánh giá tác động của các hợp chất đến việc phosphoryl hóa các JAK kinaza hoặc các cơ chất xuôi dòng có thể có như các protein STAT, Akt, Shp2, hoặc Erk. Tiến hành các thử nghiệm này sau một đêm không dùng xytokin, tiếp theo là bước ủ sơ bộ nhanh với hợp chất (2 tiếng hoặc ít hơn) và bước kích thích xytokin trong khoảng xấp xỉ 1 giờ hoặc ít hơn. Sau đó, tách chiết các protein ra khỏi các tế bào và phân tích protein này bằng các kỹ thuật đã quen thuộc với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm phép thẩm tách Western hoặc các hệ thống ELISA bằng cách sử dụng các kháng thể mà có thể phân biệt giữa protein đã phosphoryl hóa và protein toàn phần. Các thí nghiệm này có thể sử dụng các tế bào bình thường hoặc các tế bào ung thư để kiểm tra tác động của các hợp chất đối với sinh học sống còn của tế bào khối u hoặc đối với các chất trung gian gây ra bệnh viêm. Ví dụ, liên quan đến khía cạnh sau, các xytokin như IL-6, IL-12, IL-23, hoặc IFN

có thể được sử dụng để kích thích sự hoạt hóa JAK dẫn đến sự phosphoryl hóa của (các) protein STAT và có khả năng dẫn đến các profin phiên mã (được đánh giá bằng kỹ thuật mảng hoặc công nghệ qPCR) hoặc sự sản sinh và/hoặc tiết các protein, như IL-17. Khả năng ức chế của các hợp chất đối với các tác dùng gây ra bởi xytokin có thể được đo bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã quen thuộc đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các hợp chất trong bản mô tả này cũng có thể được thử nghiệm trong các mô hình tế bào được thiết kế để đánh giá hiệu quả và hoạt tính của chúng chống lại các JAK đột biến, ví dụ, đột biến JAK2V617F được thấy trong các rối loạn tăng sinh tủy. Các thử nghiệm này thường sử dụng các tế bào phụ thuộc xytokin của dòng tế bào máu (ví dụ, BaF/3) mà trong đó các JAK kinaza kiểu dại hoặc các JAK kinaza đột biến được biểu hiện sai vị trí (James, C., *et al. Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., *et al. JBC* 280:41893-41899). Các kết quả bao gồm tác động của các hợp chất đối với sự sống sót của tế bào, sự tăng sinh tế bào, và các protein JAK, STAT, Akt, hoặc Erk đã phosphoryl hóa.

Có thể đánh giá các hợp chất theo sáng chế về hoạt tính của chúng trong việc ức chế sự tăng sinh tế bào T. Thử nghiệm như vậy có thể được coi là một thử nghiệm tăng sinh được gây ra bởi xytokin thứ hai (ví dụ JAK) và cũng là một thử nghiệm đơn giản về tác dụng ức chế miễn dịch hoặc ức chế hoạt hóa miễn dịch. Tiếp theo đây là nét chính ngắn gọn về cách thức tiến hành những thử nghiệm đó. Tạo ra các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral blood mononuclear cell - PBMC) từ các mẫu máu toàn phần của người bằng cách sử dụng phương pháp phân tách Ficoll Hypaque và thu được các tế bào T (phân đoạn 2000) từ các PBMC này bằng cách gạn. Có thể duy trì các tế bào T người mới được phân lập trong môi trường nuôi cấy (RPMI 1640 được bổ sung huyết thanh thai bò 10%, penixilin 100U/ml, streptomycin 100µg/ml) ở mật độ 2×10^6 tế bào/ml ở 37°C trong tối đa 2 ngày. Để phân tích sự tăng sinh tế bào được kích thích bởi IL-2, đầu tiên xử lý các tế bào T bằng Phytohemagglutinin (PHA) ở nồng độ cuối cùng là 10µg/mL trong 72 giờ. Sau khi rửa một lần với PBS, đặt 6000 tế bào/giếng lên đĩa 96 giếng và xử lý bằng các hợp chất ở các nồng độ khác nhau trong môi trường nuôi cấy khi có mặt của IL-2 người 100U/mL (do hãng ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel cung cấp). Ủ các đĩa ở 37°C trong 72 giờ và đánh giá chỉ số tăng sinh bằng cách dùng các chất thử

phát quang CellTiter-Glo theo quy trình được khuyến cáo của nhà sản xuất (hãng Promega; Madison, WI).

Ví dụ C: Hiệu lực kháng khối u in-vivo

Có thể đánh giá các hợp chất theo sáng chế trong các mô hình ghép khối u ngoại lai của người vào chuột bị tổn thương miễn dịch. Ví dụ, có thể dùng một biến thể sinh khối u của dòng tế bào u tương bào INA-6 để cấy dưới da cho chuột SCID (Burger, R., *et al. Hematol J.* 2:42-53, 2001). Sau đó các con chuột mang khối u được xếp ngẫu nhiên vào nhóm điều trị bằng thuốc hoặc các nhóm điều trị bằng tá dược lỏng và các liều khác nhau của các hợp chất có thể được sử dụng bằng các đường dùng thông thường bất kỳ bao gồm đường miệng, trong màng bụng, hoặc truyền liên tục sử dụng các bơm cấy được. Theo dõi sự sinh trưởng của khối u theo thời gian bằng cách dùng thước kẹp. Ngoài ra, có thể thu lấy các mẫu khối u ở thời điểm bất kỳ sau khi bắt đầu điều trị để phân tích như đã mô tả trên đây (Ví dụ B) để đánh giá tác động của hợp chất đối với hoạt tính của JAK và các quá trình truyền tín hiệu xuôi dòng. Ngoài ra, có thể đánh giá tính chọn lọc của hợp chất này bằng cách sử dụng mô hình ghép khối u ngoại lai được điều khiển bởi các kinaza đã biết khác (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 theo sáng chế cũng có thể được thử nghiệm hiệu lực (ức chế các đích JAK) trong mô hình thử nghiệm tính quá mẫn muộn do tế bào T gây ra ở chuột. Phản ứng quá mẫn dạng muộn (delayed-type hypersensitivity - DTH) do tiếp xúc da ở chuột được xem là một mô hình hợp lý của bệnh viêm da tiếp xúc lâm sàng, và các rối loạn miễn dịch khác của da gây ra bởi lympho bào T, như bệnh vẩy nến (*Immunol Today*. 1998 Jan;19(1):37-44). DTH ở chuột có chung nhiều đặc điểm với bệnh vẩy nến, bao gồm sự thâm nhiễm miễn dịch, kèm theo sự gia tăng xytokin viêm, và sự siêu tăng sinh tế bào keratin. Hơn nữa, nhiều loại hợp chất mà có tác dụng trong điều trị bệnh vẩy nến trong lâm sàng cũng là các chất ức chế hiệu quả phản ứng DTH ở chuột (*Agents Actions*. 1993 Jan;38(1-2):116-21).

Vào Ngày 0 và 1, chuột Balb/c được làm mẫn cảm bằng cách bôi khu trú, ở phần bụng bị cạo lông của chúng với kháng nguyên 2,4-dinitro-florobenzen (DNFB). Vào

ngày 5, đo độ dày tai bằng cách dùng thước đo micrômét kỹ thuật. Ghi lại kết quả này và sử dụng làm đường cơ sở. Sau đó kích thích cả hai tai của con vật bằng cách cho bôi khu trú DNFB với tổng lượng 20 μ L (10 μ L ở tai trong và 10 μ L ở tai ngoài) ở nồng độ 0,2%. 24 đến 72 giờ sau khi kích thích, lại đo tai lần nữa. Việc điều trị bằng các hợp chất thử nghiệm đã được thực hiện trong toàn bộ giai đoạn gây mẫn cảm và kích thích (ngày -1 đến ngày 7) hoặc trước và trong suốt giai đoạn kích thích (thường vào chiều của ngày 4 đến ngày 7). Việc điều trị bằng các hợp chất thử nghiệm (ở nồng độ khác) được thực hiện toàn thân hoặc khu trú (bôi khu trú trong điều trị tai). Hiệu quả của các hợp chất thử nghiệm được thể hiện bằng sự giảm độ sưng của tai so với trường hợp không điều trị. Nếu hợp chất tạo ra mức độ giảm là 20% hoặc lớn hơn thì nó được xem là có hiệu quả. Trong một vài thử nghiệm, những con chuột bị kích thích nhưng không gây mẫn 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 phân tích hóa học mô miễn dịch. Việc hoạt hóa (các) con đường JAK-STAT dẫn tới sự hình thành và chuyển đổi vị trí của các yếu tố phiên mã chức năng. Hơn nữa, dòng tế bào miễn dịch đi vào và sự tăng sinh của các tế bào keratin tăng lên cũng tạo ra những thay đổi về profin biểu hiện đặc trưng trong tai mà có thể được kiểm tra và định lượng. Các phần tai được cố định bằng formalin và gắn vào parafin (thu được sau giai đoạn kích thích trong mô hình DTH) được phân tích hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng một kháng thể mà tương tác đặc hiệu với STAT3 đã phosphoryl hóa (dòng 58E12, Cell Signaling Technologies). Tai chuột được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm, tá dược lỏng, hoặc dexametasone (một phương pháp điều trị hiệu quả trong lâm sàng cho bệnh vẩy nến), hoặc không điều trị bất kỳ, trong mô hình DTH để so sánh. Hợp chất thử nghiệm và dexametasone có thể tạo ra những biến đổi phiên mã tương tự cả về mặt số lượng và chất lượng, và cả hợp chất thử nghiệm và dexametasone đều có thể làm giảm số lượng của các tế bào thâm nhiễm. Việc sử dụng hợp chất thử nghiệm toàn thân và khu trú đều có thể tạo ra tác dụng ức chế, ví dụ, làm giảm số lượng các tế bào thâm nhiễm và ức chế những biến đổi phiên mã.

Ví dụ E: Hoạt tính kháng viêm *in-vivo*

Các hợp chất ở đây có thể được đánh giá trên các mô hình loài gặm nhấm hoặc không phải loài gặm nhấm được thiết kế để lặp lại một phản ứng viêm đơn hoặc phức. Ví dụ, có thể dùng các mô hình loài gặm nhấm bị bệnh viêm khớp để đánh giá khả năng điều trị của các hợp chất được cho dùng liều để phòng hoặc chữa bệnh. Các mô hình này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm khớp do collagen ở chuột nhắt hoặc chuột cống, viêm khớp do tá được ở chuột, và viêm khớp do kháng thể collagen. Các bệnh tự miễn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đa xơ cứng, đái tháo đường typ I, viêm màng bồ đào võng mạc, viêm tuyến giáp, chứng nhược cơ, bệnh thận globulin miễn dịch, viêm cơ tim, mẫn cảm đường hô hấp (bệnh hen), luput, hoặc viêm kết tràng có thể cũng được dùng để đánh giá khả năng điều trị của các hợp chất ở đây. Các mô hình này đã được biết rõ trong cộng đồng nghiên cứu và quen thuộc với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (*Current Protocols in Immunology*, Vol 3., Coligan, J.E. *et al*, Wiley Press.; *Methods in Molecular Biology*: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. and Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

Ví dụ F: Các mô hình động vật điều trị bệnh khô mắt, 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 của bệnh khô mắt đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mô hình tuyến nước mắt concanavalin A (ConA) ở thỏ, mô hình scopolamin ở chuột (dùng dưới da hoặc qua da), mô hình tuyến nước mắt Botulinum ở chuột, hoặc mô hình bất kỳ trong số các mô hình tự miễn tự phát ở động vật gặm nhấm mà dẫn tới tình trạng rối loạn chức năng của tuyến mắt (ví dụ, 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). Các kết quả trong các mô hình này có thể bao gồm mô bệnh học của các tuyến mắt và mắt (giác mạc, v.v.) và có thể là thử nghiệm kinh điển Schirmer hoặc các phiên bản sửa đổi của nó (Barabino *et al.*) để đánh giá sự tiết nước mắt. Có thể đánh giá hoạt tính

bằng cách dùng liều qua nhiều đường sử dụng khác nhau (như toàn thân hoặc khu trú) mà có thể bắt đầu trước hoặc sau khi mắc bệnh có thể xác định được.

Các hợp chất có thể được đánh giá trong một hoặc nhiều mô hình tiền lâm sàng của bệnh viêm màng bồ đào đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mô hình viêm màng bồ đào tự miễn thử nghiệm (experimental autoimmune uveitis - EAU) và viêm màng bồ đào do nội độc tố (endotoxin induced uveitis - EIU). Có thể tiến hành các thí nghiệm EAU trên thỏ, chuột cống hoặc chuột nhắt và có thể bao gồm việc gây miễn dịch chủ động hoặc bị động. Ví dụ, có thể dùng kháng nguyên bất kỳ trong số nhiều kháng nguyên hoặc các kháng nguyên vông mạc để làm cho các động vật miễn cảm với tác nhân gây miễn dịch liên quan sau đó các động vật có thể được kích thích ở mắt bằng cùng một kháng nguyên. Mô hình EIU có tính cấp tính hơn và bao gồm việc sử dụng lipopolysaccharit khu trú hoặc toàn thân ở các liều dưới liều gây chết. Các kết quả cho cả mô hình EIU và EAU đều có thể bao gồm kiểm tra đáy mắt, mô bệnh học trong số những thử nghiệm khác. Các mô hình này được tóm tắt bởi Smith và các đồng tác giả (*Immunology và Cell Biology* 1998, 76, 497-512). Hoạt tính được đánh giá bằng cách dùng liều bằng nhiều đường khác nhau (như toàn thân hoặc khu trú) mà có thể bắt đầu trước hoặc sau khi mắc bệnh có thể xác định được. Một số mô hình liệt kê trên đây cũng có thể phát triển thành bệnh viêm củng mạc/viêm thượng củng mạc, viêm màng mạch, viêm thể mi, hoặc viêm mống mắt và vì thế, chúng hữu ích trong nghiên cứu hoạt tính tiềm năng của các hợp chất để điều trị các bệnh này.

Các hợp chất cũng có thể được đánh giá trong một hoặc nhiều mô hình viêm kết mạc tiền lâm sàng đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng 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 sử dụng chuột lang bao gồm các mô hình sử dụng quy trình gây miễn dịch thụ động hoặc chủ động và/hoặc các quy trình kích thích miễn dịch bằng các kháng nguyên như albumin trứng hoặc cỏ phấn hương (theo như đánh giá nêu trong tài liệu: Groneberg, D.A., *et al.*, *Allergy* 2003, 58, 1101-1113). Mô hình chuột nhắt và chuột cống có thiết kế chung tương tự với mô hình chuột lang (cũng được đánh giá bởi Groneberg). Có thể đánh giá hoạt tính bằng cách dùng liều qua nhiều đường sử dụng khác nhau (như toàn thân hoặc khu trú) mà có thể bắt đầu

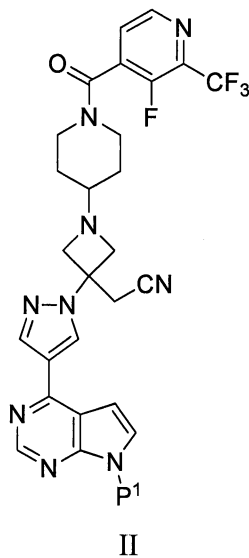
trước hoặc sau khi mắc bệnh có thể xác định được. Các kết quả cho những nghiên cứu này có thể bao gồm, ví dụ, các phân tích mô học, miễn dịch học, hóa sinh hoặc phân tử của các mô mắt như kết mạc.

Ví dụ G: Tác dụng bảo vệ xương *in vivo*

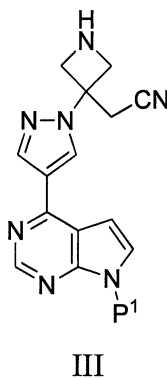
Các hợp chất có thể được đánh giá trong các mô hình tiền lâm sàng khác nhau của chứng thiếu xương, chứng loãng xương hoặc chứng tiêu xương đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các động vật gặm nhấm đã phẫu thuật cắt bỏ buồng trứng có thể được sử dụng để đánh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

YÊU CẦU BẢO HỘ

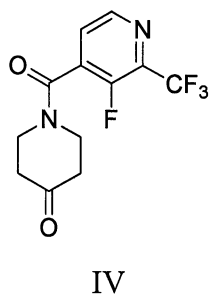
1. Quy trình điều chế hợp chất có công thức II:



hoặc muối của nó, trong đó quy trình này bao gồm bước cho hợp chất có công thức III:



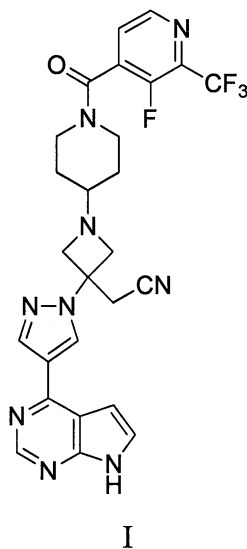
hoặc muối của nó, phản ứng với hợp chất có công thức IV:



khi có mặt chất khử để tạo thành hợp chất có công thức II hoặc muối của nó, với điều kiện chất khử nêu trên không phải là natri xyanoborohydrit hydrua;
trong đó P¹ là nhóm bảo vệ.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó nhóm bảo vệ nêu trên là -CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất khử nêu trên được chọn từ natri xyanoborohydrua và natri triaxetoxylborohydrua.
4. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất khử nêu trên là natri triaxetoxylborohydrua.
5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó các hợp chất có công thức II, III, và IV đều là bazơ tự do.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó quy trình này còn bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức II, hoặc muối của hợp chất này, để tạo thành hợp chất có công thức I:



hoặc muối của nó.

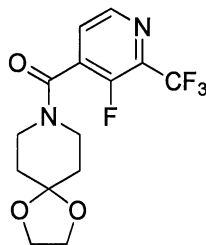
7. Quy trình theo điểm 6, trong đó bước khử bảo vệ đã nêu bao gồm bước xử lý bằng bo triflorua eterat, tiếp theo là bước xử lý bằng dung dịch nước amoni hydroxit.
8. Quy trình theo điểm 6 hoặc 7, trong đó quy trình này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức I phản ứng với axit adipic để tạo thành muối adipat.

9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó các hợp chất có công thức I, II, III, và IV đều là bazơ tự do.

10. Quy trình theo điểm 6 hoặc 7, trong đó quy trình này còn bao gồm các bước:

- (a) đun hồi lưu hợp chất có công thức I trong metanol để tạo thành hỗn hợp;
- (b) sau bước (a), thêm methyl isobutyl keton vào hỗn hợp;
- (c) sau bước (b), loại bỏ một phần dung môi bằng cách chưng cất ở nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C để tạo thành hỗn hợp cô đặc;
- (d) sau bước (c), thêm metanol vào hỗn hợp cô đặc để tạo thành hỗn hợp pha loãng;
- (e) sau bước (d), đun hồi lưu hỗn hợp pha loãng để tạo thành hỗn hợp;
- (f) sau bước (e), thêm methyl isobutyl keton vào hỗn hợp;
- (g) sau bước (f), loại bỏ một phần dung môi bằng cách chưng cất ở nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C để tạo thành hỗn hợp cô đặc;
- (h) sau bước (g), thêm axit adipic và metanol vào hỗn hợp cô đặc;
- (i) sau bước (h), đun hồi lưu hỗn hợp; và
- (j) sau bước (i), loại bỏ một phần dung môi bằng cách chưng cất ở nhiệt độ bên trong nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C để tạo thành hỗn hợp cô đặc;
- (k) sau bước (j), thêm heptan vào hỗn hợp; và
- (l) sau bước (k), khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng để tạo thành muối của axit adipic của hợp chất có công thức I.

11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10, trong đó hợp chất có công thức IV, hoặc muối của nó, được điều chế theo quy trình bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức V:



V

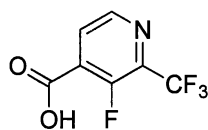
hoặc muối của nó.

12. Quy trình theo điểm 11, trong đó bước khử bảo vệ nêu trên bao gồm bước cho phản ứng với dung dịch nước axit.

13. Quy trình theo điểm 12, trong đó axit nêu trên là axit clohydric.

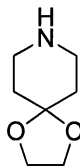
14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó các hợp chất có công thức I, II, III, IV, và V đều là bazơ tự do.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 14, trong đó hợp chất có công thức V nêu trên, hoặc muối của nó, được điều chế theo quy trình bao gồm bước cho hợp chất có công thức VI:



VI

phản ứng với hợp chất có công thức VII:

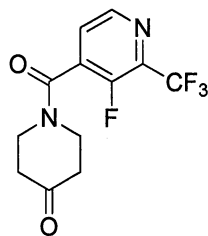


VII

khi có mặt chất kết hợp.

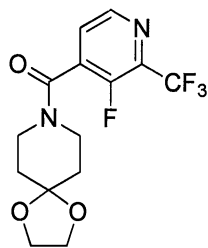
16. Quy trình theo điểm 15, trong đó chất kết hợp là benzotriazol-1-yloxy-tris(dimetylamino)-phosphoni hexaflorophosphat (BOP).

17. Quy trình điều chế hợp chất có công thức IV:



IV

hoặc muối của nó, trong đó quy trình này bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức V:



V

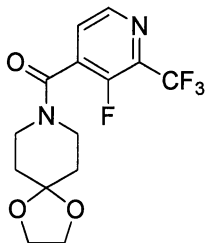
hoặc muối của nó, để tạo thành hợp chất có công thức IV, hoặc muối của nó.

18. Quy trình theo điểm 17, trong đó bước khử bảo vệ nêu trên bao gồm bước cho phản ứng với dung dịch nước axit.

19. Quy trình theo điểm 18, trong đó axit nêu trên là axit clohydric.

20. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 19, trong đó các hợp chất có công thức IV và V đều là bazơ tự do.

21. Quy trình điều chế hợp chất có công thức V:



V

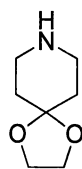
hoặc muối của nó, bao gồm bước cho hợp chất có công thức VI:



VI

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

23934

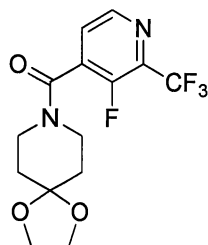


VII

hoặc muối của nó, khi có mặt chất kết hợp để tạo thành hợp chất có công thức V, hoặc muối của nó.

22. Quy trình theo điểm 21, trong đó chất kết hợp là benzotriazol-1-yloxy-tris(dimetylamino)-phosphoni hexaflorophosphat (BOP).

23. Hợp chất có công thức V:



V

hoặc muối của nó.